

NOUVEAU CANAL CATIONIQUE NEURONAL DE  
MAMMIFÈRE SENSIBLE A L'ACIDITÉ, SON CLONAGE ET SES  
APPLICATIONS.

5 La présente invention concerne une nouvelle  
famille de canaux ioniques de mammifère, notamment humain,  
sensible à l'acidité. Elle concerne plus particulièrement  
l'identification et la caractérisation moléculaire, chez  
l'homme et le rat, d'un nouveau canal cationique activé  
10 par les protons, dénommé ci-après "ASIC" pour désigner les  
termes anglais "Acid Sensing Ionic Channel". Le canal ASIC  
constitue le premier membre d'un groupe de canaux  
cationiques, appartenant à la famille des canaux sodium de  
dégénérine sensible à l'amiloride (6, 11-14), qui est  
15 activé transitoirement par une acidification  
extracellulaire.

La sensibilité à l'acide est associée à la  
fois à la nociception (1) et à la transduction du goût  
(2). La stimulation de neurones sensoriels par les acides  
revêt une grande importance, car l'acidité accompagne de  
20 nombreuses situations inflammatoires et ischémiques  
douloureuses. La douleur causée par les acides est  
interprétée comme étant médiée par des canaux cationiques  
présents au niveau des neurones sensoriels, et qui sont  
25 activés par les protons (3-5). Les propriétés biophysiques  
et pharmacologiques des canaux ASIC de l'invention sont  
proches de celles des canaux cationiques activés par les  
protons décrits dans les neurones sensoriels (3, 15, 16).  
Toutefois, comme cela apparaîtra dans la description ci-  
30 après, il n'a été à ce jour jamais décrit de canaux  
ioniques activés par un ligand plus simple que les canaux  
ASIC.

La présente invention a donc pour objet une  
35 protéine constituant un canal cationique neuronal sensible  
à l'amiloride et activé par les protons. Plus

particulièrement l'invention concerne la protéine constituant le canal ASIC dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

De tels dérivés sont ceux dont la séquence comprend une modification et/ou une suppression et/ou une addition d'un ou plusieurs résidus d'acides aminés, dès lors que cette modification et/ou suppression et/ou addition ne modifie pas les propriétés fonctionnelles et structurelles du canal ASIC, principalement son activation par les protons. De tels dérivés peuvent être analysés par l'homme du métier selon les techniques décrites dans les exemples donnés ci-après qui ont permis de mettre en évidence les propriétés biophysiques et pharmacologiques du canal ASIC.

Un exemple d'un tel dérivé fonctionnellement équivalent, est la protéine ASIC humaine dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 2, et qui est sensiblement identique à celle du canal ASIC de rat, désigné ASIC1A, représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1.

Un autre exemple d'un tel dérivé fonctionnellement équivalent, est la protéine constituant un canal cationique de dégénérine dénommé "MDEG" (14) ou "BNaCl" (20) ou encore désigné ci-après "ASIC2A" ou "MDEG1" dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3. MDEG a été décrit comme un canal cationique de mammifère sensible à l'amiloride qui est activé par des mutations responsables de neurodégénérescence avec les dégénérines de *C. elegans*. Le canal MDEG est un parent structural du canal ASIC, dont la séquence en acides aminés présente environ 67% d'homologie avec la séquence du canal ionique MDEG. Toutefois, les propriétés

électrophysiologiques de ces deux canaux sont différentes car ils ne sont pas activés par les mêmes changements de pH. Ainsi, la gamme de sensibilité de MDEG ( $EC_{50} = 4,05$ ) est différente de celle de ASIC ( $EC_{50} = 6,2$ ).

Il a été montré que le canal MDEG est activé par les mêmes mutations que celles causant une dégénérescence neuronale chez *C. elegans*. Ainsi, comme les mutants de dégénérine de *C. elegans* hyperactifs, les mutants actifs de MDEG sont responsables d'une mort cellulaire, indiquant que l'acquisition de fonction par ce canal ionique neuronal serait impliquée dans plusieurs formes de dégénérescence neuronale de mammifère et notamment humaine. Mais aucune fonction physiologique normale de MDEG n'était connue jusqu'à la mise en évidence de son activation par les protons conformément aux canaux cationiques de la présente invention.

D'autres exemples de protéines constituant un canal cationique neuronal sensible à l'amiloride et activé par les protons selon l'invention sont donnés ci-après :

- Un canal désigné ASIC1B dont la séquence de 559 acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 4. ASIC1B est un variant dépiçage du canal ASIC1A cloné à partir du cerveau de rat par PCR dégénérée. Les premiers 185 acides aminés sont remplacés par une nouvelle séquence de 218 acides aminés qui est soulignée dans la SEQ ID NO : 4.

- Un canal désigné DRASIC dont la séquence de 533 acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 5. DRASIC a été cloné à partir des neurones sensoriels de rat en utilisant une séquence partielle dans la banque de données ("Expressed Sequence Tag" avec le numéro d'accèsion W62694). Les propriétés de DRASIC sont les suivantes :

- Il est exprimé dans les neurones sensoriels mais pas dans le cerveau.

- Son expression dans les oocytes de Xénope ou dans des cellules de mammifère permet d'enregistrer un courant sodium activé par le proton qui présente deux composantes : une composante s'activant et s'inactivant rapidement et une composante s'activant plus lentement et ne s'inactivant pas. Les deux composantes sont sélectives pour le  $\text{Na}^+$ . Un canal cationique activé par le proton et ne s'inactivant pas a été impliqué dans la sensation de douleur prolongée causée par une acidose.

L'invention concerne aussi un canal cationique hybride constitué de l'association d'une première protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'invention avec une seconde protéine constituant un canal ionique activé par les protons. Avantageusement, ladite seconde protéine est aussi une protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'invention. A titre d'exemple d'une telle association, on peut citer l'association de la protéine du canal ASIC1A ou ASIC2A ou DRASIC avec la protéine du canal MDEG1, permettant de former un canal hybride présentant une troisième gamme de sensibilité au pH (avec ASIC :  $\text{EC}_{50} = 4,8$ ). Un autre exemple d'un tel canal hybride est l'association de la protéine des canaux ASIC1A, ASIC1B, MEDG1 ou DRASIC avec la protéine du canal MDEG2.

MDEG2 est un canal qui a été cloné à partir du cerveau de rat en utilisant une séquence partielle de souris accessible dans les banques de données ("Expressed Sequence Tag avec le numéro d'accension W50528") et dont la séquence de 563 acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 6.

MDEG2 est un variant d'épissage de MDEG1. Les premier 185 amino acides sont remplacés par une nouvelle séquence de 236 amino acides qui est soulignée dans la SEQ ID NO : 6. MDEG2 est exprimé dans le cerveau

et dans les neurones sensoriels des ganglions de la racine dorsale.

MDEG2 exprimé seul dans les oocytes de Xénope ou dans des cellules de mammifères ne forme pas un canal cationique activé par le proton. Néanmoins, il peut s'associer avec MDEG1 ou DRASIC pour former des canaux hétéromultimériques activés par le proton avec des propriétés modifiées :

- Le pH d'activation du canal formé après la co-expression de MDEG1 et MDEG2 est différent. Après expression dans les cellules COS, le courant n'a pas atteint sa valeur maximale à pH 3 alors que le courant induit par MDEG1 seul sature à un pH compris entre 4,5 et 4,0.

- Les cinétiques d'inactivation et la sélectivité ionique du canal formé après la co-expression de MDEG1 et MDEG2 sont clairement différentes de celles de MDEG1 seul. Un courant s'inactivant lentement et peu sélectif pour le Na<sup>+</sup> et le K<sup>+</sup> apparaît.

- Le courant sodique soutenu obtenu après expression de DRASIC devient non sélectif (il ne différencie plus le sodium et le potassium) quand MDEG2 est co-exprimé avec DRASIC. Cette nouvelle propriété est similaire à celle du canal cationique activé par le proton qui a été impliqué dans la sensation de douleur prolongée causée par une acidose. Il est très probable que DRASIC et MDEG2 fassent partie de ce canal.

Les homologues de séquences en acides aminés des protéines constituant les canaux ASIC1A, ASIC1B, cités selon l'invention sont données dans la tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

Canaux	ASIC 1B	ASIC 1A	MEDG2	MDEG1	DRASIC
ASIC1B	100	80	56	61	52
ASIC1A		100	59	68	53
MDEG2			100	78	48
MDEG1				100	51
DRASIC					100

Des anticorps poly ou monoclonaux dirigés contre au moins une protéine constituant un canal ionique de l'invention et/ou contre un canal hybride ci-dessus, peuvent être préparés par les méthodes classiques décrites dans la littérature. Ces anticorps sont utiles pour rechercher la présence des canaux ioniques de l'invention dans différents tissus humains ou animaux, mais ils peuvent aussi trouver des applications dans le domaine thérapeutique pour inhiber ou activer *in vivo*, grâce à leur spécificité, un canal ASIC et/ou ses dérivés.

La présente invention a aussi pour objet une molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour une protéine constituant un canal cationique neuronal sensible à l'amiloride et activé par les protons. Plus particulièrement l'invention concerne une molécule d'acide nucléique comprenant au moins une séquence codant pour la protéine constituant le canal ASIC dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 1 ou pour un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine. Une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour la protéine ASIC est celle représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ou sa séquence complémentaire. Une autre molécule d'ADN selon l'invention est celle représentée dans la liste de

séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 2 ou sous le numéro SEQ ID NO : 3, ou leur séquence complémentaire.

Une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour la protéine ASIC1B est celle de 3647 pb représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 4 ou sa séquence complémentaire. Plus particulièrement l'invention concerne la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 109 et 1785 de la séquence représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 4 ou sa séquence complémentaire.

Une molécule d'ADN codant pour la protéine DRASIC est celle de 1602 pb représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 5 ou sa séquence complémentaire.

Une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour la protéine MDEG2 est celle de 1602 pb représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 6 ou sa séquence complémentaire.

L'invention concerne également un vecteur comprenant au moins une molécule d'acide nucléique précédente, avantageusement associée à des séquences de contrôle adaptés, ainsi qu'un procédé de production ou d'expression dans un hôte cellulaire d'une protéine constituant un canal ionique selon l'invention. La préparation de ces vecteurs ainsi que la production ou l'expression dans un hôte des canaux de l'invention peuvent être réalisées par les techniques de biologie moléculaire et de génie génétique bien connues de l'homme du métier.

A titre d'exemple, un procédé de production d'une protéine constituant un canal cationique selon l'invention consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique de l'invention ou un vecteur contenant ladite molécule dans un hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant le canal cationique,

- à isoler, par tous moyens appropriés les protéines constituant les canaux ioniques de l'invention.

A titre d'exemple, un procédé d'expression d'un canal ionique selon l'invention consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique de l'invention ou un vecteur contenant ladite molécule dans une cellule,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant l'expression de canaux ioniques de l'invention.

L'hôte cellulaire mis en oeuvre dans les procédés précédents peut être choisi parmi les procaryotes ou les eucaryotes et notamment parmi les bactéries, les levures, les cellules de mammifères, de plantes ou d'insectes.

Le vecteur utilisé est choisi en fonction de l'hôte dans lequel il sera transféré; il peut s'agit de tout vecteur comme un plasmide.

L'invention concerne donc aussi les cellules transformées exprimant les canaux ASIC et/ou ses dérivés comme MDEG obtenues conformément aux procédés précédents. Ces cellules sont utiles pour le criblage de substances capables de moduler la perception de l'acidité, tant en ce qui concerne la nociception que la transduction du goût. Ce criblage est effectué en mettant en contact des quantités variables d'une substance à tester avec des cellules exprimant les canaux ASIC, puis en mesurant, par tous moyens appropriés, les effets éventuels de ladite substance sur les courants desdits canaux. Des techniques électrophysiologiques permettent également ces études et font aussi l'objet de la présente invention dès lors qu'elles mettent en oeuvre les canaux ASIC ou leurs



dérivés. Ces criblages permettent d'identifier de nouveaux médicaments utiles dans le traitement ou la prévention de la douleur. Ils permettent également de rechercher des agents modulateurs du goût acide. En outre, ils permettent de rechercher des bloqueurs qui sont susceptibles d'inhiber des neurodégénérescences provoquées par hyperexpression de ces canaux. Ces médicaments, isolés et détectés grâce aux procédés ci-dessus, font également partie de l'invention. Les canaux ASIC ont en effet des propriétés de sélectivité ionique, notamment en ce qui concerne leur perméabilité sélective au sodium, potassium et calcium, qui les destinent à avoir des propriétés excitotoxiques lorsqu'ils sont hyperstimulés.

Une protéine constituant un canal ionique neuronal ASIC peut être aussi utile pour la fabrication de médicaments destinés à traiter ou prévenir des pathologies impliquant la perception douloureuse de l'acidité qui intervient dans les maladies inflammatoires, les ischémies et dans un certain nombre de tumeurs. L'invention concerne donc aussi les compositions pharmaceutiques comprenant comme principe actif au moins une protéine constituant un canal ionique selon l'invention.

Une molécule d'acide nucléique codant pour une protéine constituant un canal ASIC ou un dérivé de celui-ci, ou un vecteur comprenant cette molécule d'acide nucléique ou encore une cellule exprimant des canaux ASIC, sont aussi utiles pour la préparation d'animaux transgéniques. Il peut s'agir d'animaux sur-exprimant lesdits canaux, mais surtout d'animaux dit "knock out", c'est à dire présentant une déficience en ces canaux; ces animaux transgéniques sont préparés par des méthodes connues de l'homme du métier, et permettent de disposer de modèles vivants pour l'étude de pathologies animales associées aux canaux ASIC.

Les molécules d'acide nucléique de l'invention ou les cellules transformées par ladite

molécule sont donc susceptibles d'être utilisées dans des stratégies de thérapie génique afin de compenser une déficience des canaux ASIC au niveau de un ou plusieurs tissus d'un patient. L'invention concerne donc aussi un médicament comprenant des molécules d'acide nucléique de l'invention ou de cellules transformées par lesdites molécules pour le traitement de pathologie impliquant les canaux ASIC et leurs dérivés.

Outre la propriété d'être activé par les protons et les applications décrites ci-dessus qui en résultent dans le domaine de la perception de l'acidité, le canal ASIC, du fait de sa parenté structurale avec le canal MDEG, est susceptible de se comporter comme une dégénérine neuronale à la suite de mutation.

La mort de certains neurones est caractéristique de plusieurs types de dégénérescences neuronales telles que les maladies d'Alzheimer, d'Huntington, de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, l'ataxie cérébelleuse. Seuls quelques gènes déficients sont connus et plusieurs restent encore à identifier. Le réseau neuronal primitif du nématode *C. elegans* constitue un bon modèle du développement et de la mort neuronal. La dégénérescence héréditaire chez *C. elegans* peut être due à des mutations des dégénérines deg-1, mec-4 et mec 10. Les homologies avec les sous-unités du canal sodium sensible à l'amiloride, le produit d'expression fonctionnel des chimères mec-4 du canal sodium épithélial, suggèrent que les dégénérines sont des canaux ioniques dont l'acquisition de fonction est la cause de dégénérescence neuronale.

La présente invention concerne donc aussi les applications du canal ASIC pour l'étude de ces modifications pathologiques susceptibles de conduire à des dégénérescences. Les techniques mises en oeuvre pour ces applications, par exemple pour le criblage de drogues,

sont similaires à celles décrites précédemment pour la recherche d'agents modulateurs du goût ou d'analgésiques.

En outre, une protéine constituant un canal ionique neuronal ASIC, un agoniste ou un antagoniste de celle-ci, peuvent être aussi utiles pour la fabrication de médicaments destinés à traiter ou prévenir des pathologies impliquant une dégénérescence neuronale cérébrale. L'invention concerne donc aussi les compositions pharmaceutiques comprenant comme principe actif au moins une de ces protéines éventuellement associée à un véhicule physiologiquement acceptable.

Plus particulièrement, l'invention concerne une substance chimique ou biologique capable de modifier les courants d'un canal ionique et/ou un canal hybride selon l'invention pour la préparation d'un médicament capable de moduler la perception de l'acidité, tant en ce qui concerne la nociception que la transduction du goût, chez un sujet humain ou animal.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la description qui suit se rapportant aux travaux de recherche ayant mené à la mise en évidence et à la caractérisation du canal ASIC, et dans laquelle il sera fait référence aux séquences et dessins en annexe dans lesquels :

- SEQ ID NO : 1 représente la séquence de 526 acides aminés de la protéine du canal ASIC déduite de la séquence de l'ADNc de rat.

- SEQ ID NO : 2 représente la séquence partielle de 514 acides aminés de la protéine du canal ASIC déduite de la séquence partielle de l'ADNc humain.

- SEQ ID NO : 3 représente la séquence de 512 acides aminés de la protéine du canal MDEG déduite de la séquence de l'ADNc humain.

-SEQ ID NO : 4 représente la séquence de 559 acides aminés de la protéine du canal ASIC1B ainsi que la

séquence d'une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour cette protéine.

-SEQ ID NO : 5 représente la séquence de 533 acides aminés de la protéine du canal DRASIC et la séquence d'ADN codant pour cette protéine.

-SEQ ID NO : 6 représente la séquence de 563 acides aminés de la protéine du canal MDEG2 ainsi que la séquence d'une molécule d'ADN comprenant la séquence codant pour cette protéine.

- La figure 1 représente l'alignement des séquences des protéines ASIC de rat (en haut) et humain (en bas) des séquences SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2. La comparaison de ces séquences fait apparaître l'absence de 14 acides aminés au début de la phase codante humains par rapport à celle du rat.

La figure 2 représente la comparaison de la séquence de la protéine du canal ASIC avec la séquence d'autres canaux ioniques :

- MDEG (14), un canal cationique de mammifère qui est activé par des mutations responsables de neurodégénéscences avec les dégénérines de *C. elegans*.

- FaNaCh (10), un peptide d'un canal sodium de *Helix aspersa* qui est activé par la FMRFamide.

- La dégénérine MEC-4 (12) de *C. elegans*.

Dans cette figure, les résidus identiques ou similaires à ceux de ASIC sont imprimés respectivement en blanc sur fond noir et en noir sur fond gris. Les régions supposées transmembranaires (MI, MII) d'ASIC sont marquées par des barres noires.

La figure 3 représente l'arbre phylogénétique des protéines des sous unités  $\alpha$ NaCh,  $\beta$ NaCh,  $\gamma$ NaCh,  $\delta$ NaCh du canal sodium sensible à l'amiloride et des dégénérines MEC-4, MEC-10 et DEG-1 de *C. elegans*.

La figure 4 représente la topologie qui est proposée pour cette dernière famille de canaux ioniques (30).

La figure 5 montre les propriétés biophysiques du canal ASIC1 activé par les protons.

- En a : les courants macroscopiques entrant enregistrés à -70 mV après des rapides changements du pH de pH 7,4 à pH 6.

- En b : La courbe dose réponse du pH extracellulaire. Le pH initial était de 7,4 et les points représentent les valeurs moyennes de 6 expériences. L'encart dans cette figure montre les réponses typiques à -70 mV.

- En c : les relations Q-V des patch "outside-out" avec 140 mM de  $\text{Na}^+$  (■) ou de  $\text{Li}^+$  (•) dans la solution du bain. Q est la charge transportée durant la transition de pH acide. L'encart dans cette figure montre les réponses typiques dans un milieu contenant du  $\text{Na}^+$ .

- En d : les courants activés par les protons  $\text{H}^+$  enregistrés à différents potentiels dans un patch "outside-out" dans un milieu contenant du  $\text{Na}^+$ .

- En e : les relations moyennes i-V mesurées à partir de patch "outside-out" avec 140 mM de  $\text{Na}^+$  (■), 140 mM de  $\text{Li}^+$  (•) ou 1,8 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  ( ), en tant qu'ions perméables majoritaires dans les solutions externes ; les potentiels d'inversion étaient respectivement de 65 mV, 58 mV et -34 mV.

- En f : le courant de protons à travers le canal ASIC1. Les relations entre le pic de courant et le voltage ont été mesurées à partir de patch "outside-out" dans une solution de  $\text{Na}^+$  libre,  $\text{Ca}^{2+}$  libre avec des pipettes contenant une solution de  $\text{K}^+$  libre, à pH 4 (•) et à pH 3 (■). ( ) représentent les résultats obtenus dans les mêmes conditions que (■) mais avec du KCl dans la pipette. L'encart dans cette figure montre les réponses typiques enregistrées dans les conditions ( ).

La figure 6 montre l'effet du  $\text{Ca}^{2+}$  et de l'amiloride sur le courant ASIC.

- En a : les courants activés par les protons  $H^+$  enregistrés à différents potentiels membranaires à partir d'un patch outside-out avec 1,8 mM de  $Ca^{2+}$  dans une solution de  $Na^+$  libre ; les courants se sont inversés à -35 mV.

- En b : Les relations Q-V moyennes à partir d'un patch outside-out enregistrées dans des solutions de  $Na^+$  libre contenant 1,8 mM de  $Ca^{2+}$  (o, potentiel d'inversion -34 mV) ou 0,1 mM de  $Ca^{2+}$  (\*, potentiel d'inversion -80 mV).

- En c : L'effet du  $Ca^{2+}$  externe sur le pic macroscopique de courant entrant enregistré à -70 mV et activé par un changement rapide de pH de pH 7,4 à pH 6. L'encart dans cette figure montre les réponses typiques. Les points représentent les valeurs moyennes  $\pm$  se de 5 oocytes.

- En d : L'effet de l'amiloride sur les courants activés par les protons  $H^+$  enregistré à 0 mV à partir d'un patch outside-out.

- En e : L'inhibition du courant macroscopique (induit par un changement de pH de pH 7,4 à pH 6) à -70 mV par l'amiloride et dérivés. Les points représentent les valeurs moyennes  $\pm$  se de 5 oocytes.

La figure 7 montre la distribution tissulaire de l'ARNm du canal ASIC.

- En a : L'analyse en Northern blot de l'expression ARNm du canal ASIC dans des tissus humains.

- En b : L'analyse en RT-PCR de l'expression de l'ARNm du canal ASIC dans le cerveau de rat et dans le ganglion de la racine dorsale (DRG). (+), (-) représentent respectivement les échantillons avec ou sans reverse transcriptase. Des sections d'un gel d'agarose révélé au bromure d'éthidium 1%. Les flèches indiquent la taille escomptée (657 pb) du produit de PCR.

La figure 8 représente l'hybridation *in situ*.

- En a et b : L'hybridation de sections de 6  $\mu$ m d'un ganglion de la racine dorsale d'un rat agé de 3 mois avec la sonde E marquée à la digoxigénine. En a : Une microphotographie à faible pouvoir éclairant (grossissement de 30 fois). En b : Une image à haute résolution (grossissement de 80 fois) de a. On note le marquage intense des neurones de petit diamètre (flèches). Des résultats similaires ont aussi été obtenus avec les sondes A, C et D.

- En c : La distribution de l'ARNm du canal ASIC dans le cerveau d'un rat adulte analysée par hybridation in situ avec l'oligonucléotide antisens C. Des résultats identiques ont été obtenus avec l'oligonucléotide B. Les couleurs indiquent l'abondance (rouge : haute expression ; bleu : non détectable). Les abréviations utilisées dans la figure sont les suivantes : Cer = Cerebellum ; Hip = Hypocampe ; OB = Bulbe olfactif ; Cx = Cortex.

## I - Matériels et Méthodes.

### 1) Clonage du canal ASIC.

Les séquences conservées de la famille de canaux ioniques ASIC ont été utilisées pour préparer les amorces PCR de séquences suivantes :

TTYCCIGCIRTACIITNTGYAAY, et  
CAIARICCIAIITGNCCNCCDAWRTC.

Une banque d'ADNc de cerveau de rat (Stratagène #936515) a été hybridée avec le produit de PCR de 1 kB de cerveau de rat et des clones partiels ont été isolés. L'extrémité 5' de l'ADNc (202 bp) a été isolée par PCR après une ligation adaptée à l'ADNc double brin.

### 2) Electrophysiologie.

0,25 ng d'ARNc a été injecté dans des oocytes de *Xenopus laevis* et les microélectrodes

d'enregistrement pour le voltage imposé et pour le patch-clamp ont été mises en place deux jours après l'injection. Les solutions de bains pour les enregistrements de patch outside-out et les pipettes pour les enregistrements de patch outside-out et de cellules totales, contenaient : 140 mM KCl (ou NMDG), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 10 mM Hepes, pH 7,4 (avec KOH). Les pipettes pour les enregistrements de patch outside-out et les solutions de bains pour les enregistrements de patch outside-out et de cellules totales, contenaient : 140 mM NaCl (ou LiCl ou NMDGCl), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes, pH 7,4 (ajusté avec HCl, NaOH, LiOH ou TMAOH). Les changements rapides de pH depuis le pH initial ont été obtenus par perfusion avec une solution de bain ajustée aux pH indiqués dans les figures. L'acidification intracellulaire des oocytes a été réalisée en injectant 50 nl de la solution interne à pH2 ou par perfusion et retrait d'un milieu de bain contenant 20 mM NH<sub>4</sub>Cl. Aucun des courants enregistrés n'était contaminé par le courant Ca<sup>2+</sup> sensible au Cl<sup>-</sup> de l'oocyte de *Xenopus*. Les données ont été échantillonnées à 2 kHz et filtrées à 500 Hz pour l'analyse (Logiciel Biopatch).

### 3) Analyse Northern Blot, RT-PCR et hybridation in situ.

Le Northern blot a été obtenu auprès de la Société Clontech (Palo Alto, Ca) et contenait environ 2 µg d'ARN poly(A+) par ligne. Le blot a été hybridé avec un fragment du clone partiel humain (correspondant aux bases 270 à 764 du clone de rat) marqué au <sup>32</sup>P, à 65°C dans 6xSSC. Pour l'analyse RT-PCR, 5 µg de l'ARN total de cerveau de rat et 3 µg de ganglion de la racine dorsale ont été reverse transcrits et 1/30 de l'échantillon a été amplifié par 30 cycles de PCR avec les amorces de séquences ci-dessous :

ATTGCTCTTCCCATCTCTAT, et  
TTCAAGGCCCATACCTAAGT.



Les contrôles négatifs ont été traités de façon identique, à l'exception de la reverse transcriptase qui n'a pas été ajoutée. Les oligonucléotides antisens correspondant aux bases 70 à 114 (A), 215 à 248 (B), 1821 à 1859 (C), 1896 à 1940 (D) et l'ADN double brin correspondant aux bases 1685 à 2672 ont été utilisés pour les hybridations *in situ*. Les sections de cerveau de rat adulte ont été hybridées avec les oligonucléotides B ou C dont l'extrémité était marquée au  $^{32}\text{P}$ , pour une nuit à 37°C dans 50% formamide, 2xSSC, puis lavées à température ambiante dans 1xSSC. Le signal a été aboli par un excès 500 fois d'oligonucléotides non marqués. Les sections de ganglion de la racine dorsale ont été hybridées avec les oligonucléotides A, C ou D marqués par la digoxigénine (DIG)-dUTP et avec la sonde E marquée par DIG-d-UTP par PCR. Le marquage des sondes, la préparation des échantillons, l'hybridation et la visualisation des acides nucléiques DIG avec la phosphatase alcaline conjuguée à des anticorps anti-DIG ont été réalisés conformément aux protocoles du fournisseur (Boehringer Mannheim).

#### 4) Analyse informatique.

L'alignement de séquences et l'arbre phylogénétique (substitution Kimura, option UPGMA) ont été réalisés avec le logiciel GCG (Genetics Computer Group, Madison WI).

## II - Résultats.

L'ADNc de 35 kb isolé de cerveau de rat code pour une protéine de 526 acides aminés qui présente, comme montré sur la figure 2, des homologies avec tous les membres clonés de la famille des canaux sodium de dégénéérine sensibles à l'amiloride.

Comme montré sur la figure 5, l'expression de l'ARNc dans des oocytes de *Xenopus* a induit un courant

entrant activé par les protons  $H^+$ . Les propriétés biophysiques et la pharmacologie du canal ASIC sont proches de celles décrites pour les canaux cationiques activés par les protons des neurones sensoriels (3, 15, 16). Une baisse du pH extracellulaire au dessous d'un pH de 6,9 active un courant entrant rapidement élevé et désensibilisé (figure 5 a et b). Ce canal est activé par les protons extracellulaires, puisque, comme montré sur la figure 5 (c et d), l'application d'un acide sur la face extracellulaire de patch outside-out active le canal. L'acidification intracellulaire d'oocytes et l'acidification de la face intracellulaire de patch outside-out n'active pas le canal ASIC ni n'altère le courant ASIC induit par les protons extracellulaires.

L'analyse des courbes I-V de la figure 5 (c et e) enregistrées avec différents cations extracellulaires montre que  $Na^+$  est l'ion perméable majoritaire (canal de conductance simple 14,3 pS). Comme le canal ionique sensible aux protons des neurones sensoriels (15, 16), le canal ASIC discrimine faiblement entre les cations (figure 5 c, e, f). En effet, le canal est aussi perméable à  $Li^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  et  $H^+$ , avec des rapports  $pNa^+/pLi^+ = 1,3$  (figure 5 c, e),  $pNa^+/pK^+ = 13$  (figure 5 c, e),  $pNa^+/Ca^{2+} = 2,5$  (figure 5 e) et  $pNa^+/H^+ = 0,8$  (figure 5 f). La perméabilité au  $Ca^{2+}$  de ASIC pourrait être un chemin d'entrée voltage indépendant de  $Ca^{2+}$  dans la cellule. Un courant entrant de  $Ca^{2+}$  dans la cellule à travers les canaux ASIC peut être détecté en l'absence de  $Na^+$  extracellulaire (figure 6 a, b). Comme indiqué sur la figure 5 (e) la conductance unitaire pour  $Ca^{2+}$  était de 5,2 pS. En présence de 140 mM de  $Na^+$  extracellulaire, l'augmentation des concentrations en  $Ca^{2+}$  externe, a diminué l'amplitude du courant activé par les protons (figure 6c), démontrant ainsi que  $Ca^{2+}$  inhibe la perméabilité au  $Na^+$ . Un blocage par le  $Ca^{2+}$  externe est caractéristique du  $I(H^+)$  des neurones sensoriels (17). Le

courant entrant activé par  $H^+$  dans les neurones sensoriels est inhibé par l'amiloride (18) et l'éthylisopropylamiloride (EIPA) (19). Comme montré à la figure 6 (d, e) le canal ASIC présente la même pharmacologie et est bloqué de façon réversible ( $K_d = 10 \mu M$ ) par l'amiloride et ses dérivés benzamil et EIPA.

Par ailleurs, la protéine du canal ASIC présente environ 67% d'homologie de séquences avec le canal ionique de dégénéérine dénommé "MDEG" (14) ou "BNaCl" (20). Toutefois, les propriétés électrophysiologiques de ces deux clones exprimés dans les oocytes de *Xenopus* sont clairement différentes :

- Comme montré sur la figure 5a, le canal MDEG n'est pas activé par les mêmes changements de pH que le canal ASIC.

- La substitution du résidu glycine en position 430 de MDEG par un acide aminé encombrant acide, comme la valine ou la phénylalanine active le canal (14), tout comme la mutation de l'alanine en position 704 de la dégénéérine MEC-4 cause une neurodégénérescence chez *C. elegans* (12). Des mutations identiques d'ASIC (glycine en position 431 remplacée par la valine ou la phénylalanine) n'entraînent pas d'activité et les mutants ne peuvent pas être activés par les protons.

Les canaux cationiques activés par les protons ont été décrits dans les neurones sensoriels mais aussi dans les neurones du système nerveux central (21). La distribution tissulaire de l'expression de l'ARNm du canal ASIC est en accord avec cette observation. Comme rapporté dans la figure 7a, un transcrit de 4,3 kb a été détecté dans le cerveau par analyse en Northern blot, et les résultats de la RT-PCR rapportés à la figure 7b montrent que le ganglion de la racine dorsale exprime l'ARNm de ASIC. La figure 8 (a,b) montre que l'ARNm de ASIC est bien exprimé dans les petits neurones du ganglion de la racine dorsale, ce qui supporte le fait que ASIC est

le canal cationique activé par les protons rapidement désensibilisant décrit dans les neurones sensoriels nociceptifs. Alors que la présence de canaux cationiques activés par les protons dans le ganglion de la racine dorsale est en accord avec leur fonction de détecteur de l'acidité dans la nociception, leur rôle dans le cerveau reste à établir. Les résultats d'hybridation *in situ* de la figure 8c montrent une expression large et hétérogène de l'ARNm du canal ASIC. Les niveaux d'expression les plus élevés ont été observés dans le bulbe olfactif principal, le cortex cérébral, l'hippocampe, l'habenula, le noyau amygdaloïde basolatéral et le cerebellum. L'activité synaptique s'accompagne de changements du pH extracellulaire (22, 23) et les changements localisés rapides de pH dans ou à proximité de la fente synaptique sont sensiblement plus saturés et forts que les fluctuations macroscopiques du pH rapportées.

Les canaux cationiques activés par les protons sont les seuls canaux ioniques connus qui sont directement activés par un changement du pH et il a été envisagé que les fluctuations extracellulaires du pH jouent un rôle neuromodulateur (23). L'expression de canaux cationiques dans le cerveau supporte en outre l'hypothèse que les fluctuations de pH ne sont pas seulement une activation neuronale par un produit, mais davantage un chemin de communication dans le système nerveux central.

Outre les canaux cationiques activés par les protons rapidement inactivés, il a été rapporté la présence dans les neurones sensoriels de canaux cationiques activés par les protons présentant des cinétiques plus lentes (4, 24). Les canaux cationiques activés par les protons forment probablement, comme d'autre canaux cationiques activés par un ligand (25, 26), une famille de canaux cationiques où différentes sous-unités ou combinaisons de sous-unités constituent les

canaux avec diverses propriétés pharmacologiques et biophysiques.

La sensation de l'acidité n'est pas uniquement impliquée dans la nociception, mais est aussi associée à la transduction du goût (2). Les stimulations acides activent les canaux cationiques activés par les protons dans les cellules du goût (2, 27) et l'amiloride inhibe la perception du goût acide (2). Aussi, les données tant physiologiques que pharmacologiques indiquent que ASIC et d'autres membres de cette famille sont impliqués dans la transduction du goût. Il est en effet particulièrement frappant que la même classe de canaux ioniques soit associée à différentes facettes de la perception sensorielle :

- Les canaux sodium sensibles à l'amiloride sont associés à la transduction du goût salé (2).

- Les dégénérines de *C. elegans* sont impliquées dans la mécanotransduction et ont été proposées comme formant des canaux ioniques mécanosensibles (28, 29).

- les canaux ASIC sont impliqués dans la nociception et dans la transduction du goût acide.

Le clonage du canal ASIC permet de disposer d'un nouvel outil d'investigation de ce groupe de canaux ioniques et de développer des bloquants spécifiques trouvant leur utilisation notamment comme analgésiques.

Liste des références

1. Rang, H.P., Bevan, S. & Dray, A. *Br. Med. Bull.* 47, 534-548 (1991).
2. Lindemann, B. *Physiol. Rev.* 76, 718-766 (1996).
3. Krishtal, O.A. & Pidoplichko, V.I. *Neuroscience* 6, 2599-2601 (1981).
4. Bevan, S. & Geppetti, P. *Trends Neurosci.* 17, 509-512 (1994).
5. Akaike, N., Krishtal, O.A. & Maruyama, T. *J. Neurophysiol.* 63, 805-813 (1990).
6. Canessa, C.M., Horisberger, J.D. & Rossier, B.C. *Nature* 361, 467-470 (1993).
7. Canessa, C.M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J.D. & Rossier, B.C. *Nature* 367, 463-467 (1994).
8. Lingueglia, E., Voilley, N., Waldmann, R., Lazdunski, M. & Barbry, P. *Febs Lett.* 318, 95-99 (1993).
9. Lingueglia, E., Renard, S., Waldmann, R., Voilley, N., Champigny, G., Plass, H., Lazdunski, M. & Barbry, P. *J. Biol. Chem.* 269, 13736-13739 (1994).
10. Lingueglia, E., Champigny, G., Lazdunski, M. & Barbry, P. *Nature* 378, 730-733 (1995).
11. Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Voilley, N. & Lazdunski, M. *J. Biol. Chem.* 270, 27411-27414 (1995).
12. Driscoll, M. & Chalfie, M. *Nature* 349, 588-593 (1991).
13. Huang, M. & Chalfie, M. *Nature* 367, 467-470 (1994).
14. Waldmann, R., Champigny, G., Voilley, N., Lauritzen, I. & Lazdunski, M. *J. Biol. Chem.* 271, 10433-10434 (1996).
15. Kovalchuk Yu, N., Krishtal, O.A. & Nowycky, M.C. *Neurosci. Lett.* 115, 237-242 (1990).
16. Konnerth, A., Lux, H.D. & Morad, M. *J. Physiol.* 386, 603-633 (1987).
17. Davies, N.W., Lux, H.D. & Morad, M. *J. Physiol.* 400, 159-187 (1988).
18. Korkushko, A. O. & Krishtal, O.A. *Neirofiziologiia* 16, 557-561 (1984).
19. Grantyn, R., Perouansky, M., Rodriguez-Tebar, A. & Lux, H.D. *Dev. Brain Res.* 49, 150-155 (1989).

B65080" B546760

20. Price, M.P., Snyder, P.M. & Welsh, M.J. *J. Biol. Chem.* 271, 7879-7882 (1996).
21. Akaike, N. & Ueno, S. *Prog. Neurobiol.* 43, 73-83 (1994).
22. Krishtal, O.A., Osipchuk, Y.V., Shelest, T.N. & Smirnoff, S.V. *Brain Res.* 436, 352-356 (1987).
23. Chesler, M. & Kaila, K. *Trends Neurosci.* 15, 396-402 (1992).
24. Bevan, S. & Yeats, J. *J. Physiol.* 433, 145-161 (1991).
25. Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R. A., Buell, G. & Surprenant, A. *Nature* 377, 432-435 (1995).
26. Barnard, E.A. *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 305 - 309 (1996).
27. Okada, Y., Miyamoto, T. & Sato, T. *J. Exp. Biol.* 187, 19-32 (1994).
28. Liu, J., Schrank, B. & Waterston, R. *Science* 273, 361 (1996).
29. Waldmann, R., Champigny, G. & Lazdunski, M. *J. Biol. Chem.* 270, 11735-11737 (1995).
30. Renard, S., Lingueglia, E., Voilley, N., Lazdunski, M. & Barbry, P. *J. Biol. Chem.* 269, 12981-12986 (1994).

## LISTE DE SÉQUENCES.

NOMBRE DE SÉQUENCES : 6

5 INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:1 :

i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SEQUENCE :

A) LONGUEUR : 3562 paires de base

B) TYPE : acide nucléique

10 C) NOMBRE DE BRINS : double

D) CONFIGURATION : linéaire

ii) TYPE DE MOLECULE : ADN

vi) ORIGINE : rat

15

ix) CARACTÉRISTIQUE

A) NOM/CLE : ASIC

B) LOCALISATION : 123 .. 1700

## 20 xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:1 :

CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACAGAAC CTGCGCCTGT 60

GCCTGTGCCT GTGCCTGTGC CTGTTTGAGA GCTGGAGACA CAGAAGGATC CCCTTGCAA 120

GG ATG GAA TTG AAG ACC GAG GAG GAG GAG GTG GGT GGT GTC CAG CCG 167

Met Glu Leu Lys Thr Glu Glu Glu Glu Val Gly Gly Val Gln Pro

1 5 10 15

GTG AGC ATC CAG GCT TTC GCC AGC AGC TCC ACG CTG CAT GGT CTT GCC 215

Val Ser Ile Gln Ala Phe Ala Ser Ser Ser Thr Leu His Gly Leu Ala

20 25 30

CAC ATC TTC TCC TAT GAG CGG CTG TCT CTG AAG CGG GCA CTG TGG GCC 263

His Ile Phe Ser Tyr Glu Arg Leu Ser Leu Lys Arg Ala Leu Trp Ala

35 40 45

CTG TGC TTC CTG GGT TCG CTG GCC GTC CTG CTG TGT GTG TGC ACT GAG 311

Leu Cys Phe Leu Gly Ser Leu Ala Val Leu Leu Cys Val Cys Thr Glu

50 55 60

CGT GTG CAG TAC TAC TTC TGC TAT CAC CAC GTC ACC AAG CTT GAC GAA 359

Arg Val Gln Tyr Tyr Phe Cys Tyr His His Val Thr Lys Leu Asp Glu

65 70 75

GTG GCT GCC TCC CAG CTC ACC TTC CCT GCT GTC ACA CTG TGC AAT CTC 407

Val Ala Ala Ser Gln Leu Thr Phe Pro Ala Val Thr Leu Cys Asn Leu

80 85 90 95

AAT GAG TTC CGC TTT AGC CAA GTC TCC AAG AAT GAC CTG TAC CAT GCT 455

Asn Glu Phe Arg Phe Ser Gln Val Ser Lys Asn Asp Leu Tyr His Ala

100 105 110

GGG GAG CTG CTG GCC CTG CTC AAC AAC AGG TAT GAG ATC CCG GAC ACA 503

Gly Glu Leu Leu Ala Leu Leu Asn Asn Arg Tyr Glu Ile Pro Asp Thr

115 120 125



		CAG	ATG	GCT	GAT	GAA	AAG	CAG	CTA	GAG	ATA	TTG	CAG	GAC	AAG	GCC	AAC	551
		Gln	Met	Ala	Asp	Glu	Lys	Gln	Leu	Glu	Ile	Leu	Gln	Asp	Lys	Ala	Asn	
				130					135					140				
5		TTC	CGG	AGC	TTC	AAG	CCC	AAG	CCC	TTC	AAC	ATG	CGT	GAA	TTC	TAC	GAC	599
		Phe	Arg	Ser	Phe	Lys	Pro	Lys	Pro	Phe	Asn	Met	Arg	Glu	Phe	Tyr	Asp	
			145					150					155					
10		AGA	GCG	GGG	CAC	GAT	ATT	CGA	GAC	ATG	CTG	CTC	TCG	TGC	CAC	TTC	CGT	647
		Arg	Ala	Gly	His	Asp	Ile	Arg	Asp	Met	Leu	Leu	Ser	Cys	His	Phe	Arg	
			160				165					170					175	
15		GGG	GAG	GCC	TGC	AGC	GCT	GAA	GAT	TTC	AAA	GTG	GTC	TTC	ACT	CGG	TAT	695
		Gly	Glu	Ala	Cys	Ser	Ala	Glu	Asp	Phe	Lys	Val	Val	Phe	Thr	Arg	Tyr	
						180					185					190		
20		GGG	AAG	TGT	TAC	ACA	TTC	AAC	TCG	GGC	CAA	GAT	GGG	CGG	CCA	CGG	CTG	743
		Gly	Lys	Cys	Tyr	Thr	Phe	Asn	Ser	Gly	Gln	Asp	Gly	Arg	Pro	Arg	Leu	
					195					200					205			
25		AAG	ACC	ATG	AAA	GGT	GGG	ACT	GGC	AAT	GGC	CTG	GAG	ATC	ATG	CTG	GAC	791
		Lys	Thr	Met	Lys	Gly	Gly	Thr	Gly	Asn	Gly	Leu	Glu	Ile	Met	Leu	Asp	
				210					215					220				
30		ATT	CAG	CAA	GAT	GAA	TAT	TTG	CCT	GTG	TGG	GGA	GAG	ACC	GAC	GAG	ACA	839
		Ile	Gln	Gln	Asp	Glu	Tyr	Leu	Pro	Val	Trp	Gly	Glu	Thr	Asp	Glu	Thr	
				225				230					235					
35		TCC	TTC	GAA	GCA	GGC	ATC	AAA	GTG	CAG	ATC	CAC	AGT	CAG	GAT	GAA	CCC	887
		Ser	Phe	Glu	Ala	Gly	Ile	Lys	Val	Gln	Ile	His	Ser	Gln	Asp	Glu	Pro	
							240		245			250					255	
40		CCT	TTC	ATC	GAC	CAG	CTG	GGC	TTT	GGT	GTG	GCT	CCA	GGT	TTC	CAG	ACG	935
		Pro	Phe	Ile	Asp	Gln	Leu	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Pro	Gly	Phe	Gln	Thr	
						260					265					270		
45		TTT	GTG	TCT	TGC	CAG	GAG	CAG	AGG	CTC	ATC	TAC	CTG	CCC	TCA	CCC	TGG	983
		Phe	Val	Ser	Cys	Gln	Glu	Gln	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Pro	Ser	Pro	Trp	
					275					280					285			
50		GGC	ACC	TGC	AAT	GCT	GTT	ACC	ATG	GAC	TCG	GAT	TTC	TTC	GAC	TCC	TAC	1031
		Gly	Thr	Cys	Asn	Ala	Val	Thr	Met	Asp	Ser	Asp	Phe	Phe	Asp	Ser	Tyr	
				290					295					300				
55		AGC	ATC	ACT	GCC	TGC	CGG	ATT	GAT	TGC	GAG	ACG	CGT	TAC	CTG	GTG	GAG	1079
		Ser	Ile	Thr	Ala	Cys	Arg	Ile	Asp	Cys	Glu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Val	Glu	
				305				310					315					
60		AAC	TGC	AAC	TGC	CGT	ATG	GTG	CAC	ATG	CCA	GGG	GAC	GCC	CCA	TAC	TGC	1127
		Asn	Cys	Asn	Cys	Arg	Met	Val	His	Met	Pro	Gly	Asp	Ala	Pro	Tyr	Cys	
							320					330					335	
65		ACT	CCA	GAG	CAG	TAC	AAG	GAG	TGT	GCA	GAT	CCT	GCC	CTG	GAC	TTC	CTA	1175
		Thr	Pro	Glu	Gln	Tyr	Lys	Glu	Cys	Ala	Asp	Pro	Ala	Leu	Asp	Phe	Leu	
						340					345					350		
70		GTG	GAG	AAA	GAC	CAG	GAA	TAC	TGC	GTG	TGT	GAG	ATG	CCT	TGC	AAC	CTG	1223
		Val	Glu	Lys	Asp	Gln	Glu	Tyr	Cys	Val	Cys	Glu	Met	Pro	Cys	Asn	Leu	
					355					360					365			

	ACC	CGC	TAC	GGC	AAG	GAG	CTG	TCC	ATG	GTC	AAG	ATC	CCA	AGC	AAA	GCC	1271
	Thr	Arg	Tyr	Gly	Lys	Glu	Leu	Ser	Met	Val	Lys	Ile	Pro	Ser	Lys	Ala	
			370					375					380				
5	TCC	GCC	AAG	TAC	CTG	GCC	AAG	AAG	TTC	AAC	AAA	TCG	GAG	CAG	TAC	ATA	1319
	Ser	Ala	Lys	Tyr	Leu	Ala	Lys	Lys	Phe	Asn	Lys	Ser	Glu	Gln	Tyr	Ile	
		385					390					395					
10	GGG	GAG	AAC	ATT	CTG	GTG	CTG	GAC	ATT	TTC	TTT	GAA	GTC	CTC	AAC	TAT	1367
	Gly	Glu	Asn	Ile	Leu	Val	Leu	Asp	Ile	Phe	Phe	Glu	Val	Leu	Asn	Tyr	
	400					405					410					415	
15	GAG	ACC	ATC	GAG	CAG	AAA	AAG	GCC	TAT	GAG	ATC	GCA	GGG	CTG	TTG	GGT	1415
	Glu	Thr	Ile	Glu	Gln	Lys	Lys	Ala	Tyr	Glu	Ile	Ala	Gly	Leu	Leu	Gly	
					420					425					430		
20	GAC	ATC	GGG	GGC	CAG	ATG	GGG	TTG	TTC	ATC	GGT	GCC	AGC	ATC	CTC	ACC	1463
	Asp	Ile	Gly	Gly	Gln	Met	Gly	Leu	Phe	Ile	Gly	Ala	Ser	Ile	Leu	Thr	
				435					440					445			
25	GTG	CTG	GAA	CTC	TTT	GAC	TAT	GCC	TAC	GAG	GTC	ATT	AAG	CAC	AGG	CTG	1511
	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Glu	Val	Ile	Lys	His	Arg	Leu	
			450					455					460				
30	TGC	AGA	CGT	GGA	AAG	TGC	CAG	AAG	GAG	GCT	AAG	AGG	AGC	AGC	GCA	GAC	1559
	Cys	Arg	Arg	Gly	Lys	Cys	Gln	Lys	Glu	Ala	Lys	Arg	Ser	Ser	Ala	Asp	
		465					470					475					
35	AAG	GGC	GTG	GCG	CTC	AGC	CTG	GAT	GAC	GTC	AAA	AGA	CAC	AAT	CCC	TGC	1607
	Lys	Gly	Val	Ala	Leu	Ser	Leu	Asp	Asp	Val	Lys	Arg	His	Asn	Pro	Cys	
	480					485					490					495	
40	GAG	AGC	CTC	CGA	GGA	CAT	CCT	GCC	GGG	ATG	ACG	TAC	GCT	GCC	AAC	ATC	1655
	Glu	Ser	Leu	Arg	Gly	His	Pro	Ala	Gly	Met	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asn	Ile	
					500					505					510		
45	CTA	CCT	CAC	CAT	CCC	GCT	CGA	GGC	ACG	TTT	GAG	GAC	TTT	ACC	TGC	TAA	1703
	Leu	Pro	His	His	Pro	Ala	Arg	Gly	Thr	Phe	Glu	Asp	Phe	Thr	Cys	*	
				515					520						526		
50	GCCCTCGCAG	GCCGCTGTAC	CAAAGGCCTA	GGTGGGGAGG	GCTGGGGGAG	CAAGGGGCCC											1763
55	CCAAC TGCCC	CCAGCTACCC	TGTGGACTTA	ACTGCATTCC	TGGTCAGTGG	TTCCCTCTTG											1823
60	TCTGTGGTGA	GAAAGGAGTC	TTGACCATAG	AGTCCTCTCC	CAGCCTCTAT	CCCATCTTTT											1943
65	TATTTTAATT	TAATCACATT	TGCTCTGTAA	TATTGCTTGA	GGCTGGGGAT	CGTGATTTCC											2003
70	CCCCAGTTCT	TTTATTGTTG	AGAATAGTTT	TCTCTATTCT	GGGTTTCTG	TTATTTCAAA											2063
75	TGAATCTGCA	AATTGCTCTT	CCCATCTCTA	TGAAGAATTG	CGTTGGAAAT	TTGATGGGGA											2123
80	TTGTATTGAA	TCTGTAGATT	GCCTTTGGTA	AGATGGCCAT	TTTTACTATG	TTAATCCTGC											2183
85	CAATTCATGA	GCAAGGGAGA	TCTTTCTATC	TCTGAAATCT	ACTTCAGTTT	CTTTCCTTCAG											2243
90	AGACTTGAAG	TTCTTGTCAT	AAAAATCTTT	TTGGTTAGAG	CCACACCAAG	GTATTTTATA											2303
95	TTGTTTGTGA	CTATTGTGAA	TGGTGTCAAT	TCCCTAATTT	CCTTCTCAGC	CTACTTATCC											2363

25  
30  
35  
40

INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:2 :

i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

A) LONGUEUR : 1620 paires de base

B) TYPE : acide nucléique

C) NOMBRE DE BRINS : double

D) CONFIGURATION : linéaire

ii) TYPE DE MOLECULE : ADN

vi) ORIGINE : homme

ix) CARACTERISTIQUE

A) NOM/CLE : ASIC

B) LOCALISATION : 1 .. 1542

xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:2 :

CCG GTG AGC ATC CAG GCC TTC GCC AGC AGC TCC ACA CTG CAC GGC ATG	48
Pro Val Ser Ile Gln Ala Phe Ala Ser Ser Ser Thr Leu His Gly Met	
1 5 10 15	
GCC CAC ATC TTC TCC TAC GAG CGG CTG TCT CTG AAG CGG GCA CTG TGG	96
Ala His Ile Phe Ser Tyr Glu Arg Leu Ser Leu Lys Arg Ala Leu Trp	
20 25 30	
GCC CTG TGC TTC CTG GGC TCG CTG GCT GTG CTG CTG TGT GTG TGC ACG	144
Ala Leu Cys Phe Leu Gly Ser Leu Ala Val Leu Leu Cys Val Cys Thr	
35 40 45	
GAG CGT GTG CAG TAC TAC TTC CAC TAC CAC CAT GTC ACC AAG CTC GAC	192
Glu Arg Val Gln Tyr Tyr Phe His Tyr His His Val Thr Lys Leu Asp	
50 55 60	
GAG GTG GCT GCC TCT CAG CTT ACC TTC CCT GCT GTC ACG CTG TGC AAC	240
Glu Val Ala Ala Ser Gln Leu Thr Phe Pro Ala Val Thr Leu Cys Asn	
65 70 75 80	
CTC AAC GAG TTC CGC TTT AGC CAA GTC TCC AAG AAT GAC CTG TAT CAT	288
Leu Asn Glu Phe Arg Phe Ser Gln Val Ser Lys Asn Asp Leu Tyr His	
85 90 95	
GCT GGG GAG CTG CTG GCC CTG CTC AAC AAC AGG TAT GAG ATA CCA GAC	336
Ala Gly Glu Leu Leu Ala Leu Leu Asn Asn Arg Tyr Glu Ile Pro Asp	
100 105 110	
ACA CAG ATG GCA GAT GAA AAG CAG CTG GAG ATA CTG CAG GAC AAA GCC	384
Thr Gln Met Ala Asp Glu Lys Gln Leu Glu Ile Leu Gln Asp Lys Ala	
115 120 125	
AAC TTC CGC AGC TTC AAA CCC AAA CCC TTC AAC ATG CGT GAG TTC TAC	432
Asn Phe Arg Ser Phe Lys Pro Lys Pro Phe Asn Met Arg Glu Phe Tyr	
130 135 140	
GAC CGA GCT GGG CAC GAC ATT CGA GAC ATG CTG CTC TCC TGC CAC TTC	480
Asp Arg Ala Gly His Asp Ile Arg Asp Met Leu Leu Ser Cys His Phe	
145 150 155 160	

	CGG	GGG	GAG	GTC	TGC	AGC	GCT	GAA	GAC	TTC	AAG	GTG	GTC	TTC	ACA	CGC	528
	Arg	Gly	Glu	Val	Cys	Ser	Ala	Glu	Asp	Phe	Lys	Val	Val	Phe	Thr	Arg	
					165					170					175		
5	TAT	GGA	AAG	TGC	TAC	ACG	TTC	AAC	TCG	GGC	CGA	AAT	GGG	CGG	CCG	CGG	576
	Tyr	Gly	Lys	Cys	Tyr	Thr	Phe	Asn	Ser	Gly	Arg	Asn	Gly	Arg	Pro	Arg	
				180					185					190			
10	CTG	AAG	ACC	ATG	AAG	GGT	GGG	ACG	GGC	AAT	GGG	CTG	GAA	ATC	ATG	CTG	624
	Leu	Lys	Thr	Met	Lys	Gly	Gly	Thr	Gly	Asn	Gly	Leu	Glu	Ile	Met	Leu	
			195					200					205				
15	GAC	ATC	CAG	CAG	GAC	GAG	TAC	CTG	CCT	GTG	TGG	GGG	GAG	ACT	GAC	GAG	672
	Asp	Ile	Gln	Gln	Asp	Glu	Tyr	Leu	Pro	Val	Trp	Gly	Glu	Thr	Asp	Glu	
		210					215					220					
20	ACG	TCT	TTC	GAA	GCA	GGC	ATC	AAA	GTG	CAG	ATC	CAT	AGT	CAG	GAT	GAA	720
	Thr	Ser	Phe	Glu	Ala	Gly	Ile	Lys	Val	Gln	Ile	His	Ser	Gln	Asp	Glu	
	225					230					235					240	
25	CCT	CCT	TTC	ATC	GAC	CAG	CTG	GGC	TTT	GGC	GTG	GCC	CCA	GGC	TTC	CAG	768
	Pro	Pro	Phe	Ile	Asp	Gln	Leu	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Pro	Gly	Phe	Gln	
					245				250						255		
30	ACC	TTT	GTG	GCC	TGC	CAG	GAG	CAG	CGG	CTC	ATA	TAC	CTG	CCC	CCA	CCC	816
	Thr	Phe	Val	Ala	Cys	Gln	Glu	Gln	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Pro	Pro	Pro	
				260					265					270			
35	TGG	GGC	ACC	TGC	AAA	GCT	GTT	ACC	ATG	GAC	TCG	GAT	TTG	GAT	TTC	TTC	864
	Trp	Gly	Thr	Cys	Lys	Ala	Val	Thr	Met	Asp	Ser	Asp	Leu	Asp	Phe	Phe	
			275					280					285				
40	GAC	TCC	TAC	AGC	ATC	ACT	GCC	TGC	CGC	ATC	GAC	TGT	GAG	ACG	CGC	TAC	912
	Asp	Ser	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ala	Cys	Arg	Ile	Asp	Cys	Glu	Thr	Arg	Tyr	
		290					295					300					
45	CTG	GTG	GAG	AAC	TGC	AAC	TGC	CGC	ATG	GTG	CAC	ATG	CCA	GGG	GAT	GCC	960
	Leu	Val	Glu	Asn	Cys	Asn	Cys	Arg	Met	Val	His	Met	Pro	Gly	Asp	Ala	
	305					310					315					320	
50	CCA	TAC	TGT	ACT	CCA	GAG	CAG	TAC	AAG	GAG	TGT	GCA	GAT	CCT	GCT	CTG	1008
	Pro	Tyr	Cys	Thr	Pro	Glu	Gln	Tyr	Lys	Glu	Cys	Ala	Asp	Pro	Ala	Leu	
					325					330					335		
55	GAC	TTC	CTG	GTG	GAG	AAG	GAC	CAG	GAG	TAC	TGC	GTG	TGT	GAA	ATG	CCT	1056
	Asp	Phe	Leu	Val	Glu	Lys	Asp	Gln	Glu	Tyr	Cys	Val	Cys	Glu	Met	Pro	
				340					345					350			
60	TGC	AAC	CTG	ACC	CGC	TAT	GGC	AAA	GAG	CTG	TCC	ATG	GTC	AAG	ATC	CCC	1104
	Cys	Asn	Leu	Thr	Arg	Tyr	Gly	Lys	Glu	Leu	Ser	Met	Val	Lys	Ile	Pro	
			355					360					365				
65	AGC	AAA	GCC	TCA	GCC	AAG	TAC	CTG	GCC	AAG	AAG	TTC	AAC	AAA	TCT	GAG	1152
	Ser	Lys	Ala	Ser	Ala	Lys	Tyr	Leu	Ala	Lys	Lys	Phe	Asn	Lys	Ser	Glu	
		370					375					380					
70	CAA	TAC	ATA	GGG	GAG	AAC	ATC	CTG	GTG	CTG	GAC	ATT	TTC	TTT	GAA	GTC	1200
	Gln	Tyr	Ile	Gly	Glu	Asn	Ile	Leu	Val	Leu	Asp	Ile	Phe	Phe	Glu	Val	
	385					390					395					400	

35

INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:3 :

i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

A) LONGUEUR : 1666 paires de base

B) TYPE : acide nucléique

C) NOMBRE DE BRINS : double

D) CONFIGURATION : linéaire

ii) TYPE DE MOLECULE : ADN

vi) ORIGINE : homme

ix) CARACTERISTIQUE

A) NOM/CLE : MDEG

B) LOCALISATION : 127 .. 1663

xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:3 :

TCTGGCGCGA TGCTTACCTT GCGTTCTCTC CCCTGAACGT CAAGGTTTAA GCAGAGCCCCG 60

AGGACTGGGA GCTCTTCTCT GAAATTCGAT CAACCTGAAG CCAGTTGCGG AACTGCACGG 120

GGTCCCG ATG GAC CTC AAG GAA AGC CCC AGT GAG GGC AGC CTG CAA CCT 169  
 Met Asp Leu Lys Glu Ser Pro Ser Glu Gly Ser Leu Gln Pro  
 1 5 10

TCT AGC ATC CAG ATC TTT GCC AAC ACC TCC ACC CTC CAT GGC ATC CGC 217  
 Ser Ser Ile Gln Ile Phe Ala Asn Thr Ser Thr Leu His Gly Ile Arg  
 15 20 25 30

CAC ATC TTC GTG TAT GGG CCG CTG ACC ATC CGG CGT GTG CTG TGG GCA 265  
 His Ile Phe Val Tyr Gly Pro Leu Thr Ile Arg Arg Val Leu Trp Ala  
 35 40 45

GTG GCC TTC GTG GGC TCT CTG GGC CTG CTG CTG GTG GAG AGC TCT GAG 313  
 Val Ala Phe Val Gly Ser Leu Gly Leu Leu Val Glu Ser Ser Glu  
 50 55 60

AGG GTG TCC TAC TAC TTC TCC TAC CAG CAT GTC ACT AAG GTG GAC GAA 361  
 Arg Val Ser Tyr Tyr Phe Ser Tyr Gln His Val Thr Lys Val Asp Glu  
 65 70 75

GTG GTG GCT CAA AGC CTG GTC TTC CCA GCT GTG ACC CTC TGT AAC CTC 409  
 Val Val Ala Gln Ser Leu Val Phe Pro Ala Val Thr Leu Cys Asn Leu  
 80 85 90

AAT GGC TTC CGG TTC TCC AGG CTC ACC ACC AAC GAC CTG TAC CAT GCT 457  
 Asn Gly Phe Arg Phe Ser Arg Leu Thr Thr Asn Asp Leu Tyr His Ala  
 95 100 105 110

GGG GAG CTG CTG GCC CTG CTG GAT GTC AAC CTG CAG ATC CCG GAC CCC 505  
 Gly Glu Leu Leu Ala Leu Leu Asp Val Asn Leu Gln Ile Pro Asp Pro  
 115 120 125

CAT CTG GCT GAC CCC TCC GTG CTG GAG GCC CTG CGG CAG AAG GCC AAC 553  
 His Leu Ala Asp Pro Ser Val Leu Glu Ala Leu Arg Gln Lys Ala Asn  
 130 135 140

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55

	TTC	AAG	CAC	TAC	AAA	CCC	AAG	CAG	TTC	AGC	ATG	CTG	GAG	TTC	CTG	CAC	601
	Phe	Lys	His	Tyr	Lys	Pro	Lys	Gln	Phe	Ser	Met	Leu	Glu	Phe	Leu	His	
			145					150					155				
5	CGT	GTG	GGC	CAT	GAC	CTG	AAG	GAT	ATG	ATG	CTC	TAC	TGC	AAG	TTC	AAA	649
	Arg	Val	Gly	His	Asp	Leu	Lys	Asp	Met	Met	Leu	Tyr	Cys	Lys	Phe	Lys	
		160					165					170					
10	GGG	CAG	GAG	TGC	GGC	CAC	CAA	GAC	TTC	ACC	ACA	GTG	TTT	ACA	AAA	TAT	697
	Gly	Gln	Glu	Cys	Gly	His	Gln	Asp	Phe	Thr	Thr	Val	Phe	Thr	Lys	Tyr	
		175				180					185					190	
15	GGG	AAG	TGT	TAC	ATG	TTT	AAC	TCA	GGC	GAG	GAT	GGC	AAA	CCT	CTG	CTC	745
	Gly	Lys	Cys	Tyr	Met	Phe	Asn	Ser	Gly	Glu	Asp	Gly	Lys	Pro	Leu	Leu	
				195						200					205		
20	ACC	ACG	GTC	AAG	GGG	GGG	ACA	GGC	AAC	GGG	CTG	GAG	ATC	ATG	CTG	GAC	793
	Thr	Thr	Val	Lys	Gly	Gly	Thr	Gly	Asn	Gly	Leu	Glu	Ile	Met	Leu	Asp	
			210						215					220			
25	ATT	CAG	CAG	GAT	GAG	TAC	CTG	CCC	ATC	TGG	GGA	GAG	ACA	GAG	GAA	ACG	841
	Ile	Gln	Gln	Asp	Glu	Tyr	Leu	Pro	Ile	Trp	Gly	Glu	Thr	Glu	Glu	Thr	
			225					230					235				
30	ACA	TTT	GAA	GCA	GGA	GTG	AAA	GTT	CAG	ATC	CAC	AGT	CAG	TCT	GAG	CCA	889
	Thr	Phe	Glu	Ala	Gly	Val	Lys	Val	Gln	Ile	His	Ser	Gln	Ser	Glu	Pro	
		240					245					250					
35	CCT	TTC	ATC	CAA	GAG	CTG	GGC	TTT	GGG	GTG	GCT	CCA	GGG	TTC	CAG	ACC	937
	Pro	Phe	Ile	Gln	Glu	Leu	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Pro	Gly	Phe	Gln	Thr	
		255				260					265					270	
40	TTT	GTG	GCC	ACA	CAG	GAG	CAG	AGG	CTC	ACA	TAC	CTG	CCC	CCA	CCG	TGG	985
	Phe	Val	Ala	Thr	Gln	Glu	Gln	Arg	Leu	Thr	Tyr	Leu	Pro	Pro	Pro	Trp	
				275					280						285		
45	GGT	GAG	TGC	CGA	TCC	TCA	GAG	ATG	GGC	CTC	GAC	TTT	TTT	CCT	GTT	TAC	1033
	Gly	Glu	Cys	Arg	Ser	Ser	Glu	Met	Gly	Leu	Asp	Phe	Phe	Pro	Val	Tyr	
				290					295					300			
50	AGC	ATC	ACC	GCC	TGT	AGG	ATT	GAC	TGT	GAG	ACC	CGC	TAC	ATT	GTG	GAA	1081
	Ser	Ile	Thr	Ala	Cys	Arg	Ile	Asp	Cys	Glu	Thr	Arg	Tyr	Ile	Val	Glu	
			305					310					315				
55	AAC	TGC	AAC	TGC	CGC	ATG	GTT	CAC	ATG	CCA	GGG	GAT	GCC	CCT	TTT	TGT	1129
	Asn	Cys	Asn	Cys	Arg	Met	Val	His	Met	Pro	Gly	Asp	Ala	Pro	Phe	Cys	
		320					325					330					
60	ACC	CCT	GAG	CAG	CAC	AAG	GAG	TGT	GCA	GAG	CCT	GCC	CTA	GGT	CTG	TTG	1177
	Thr	Pro	Glu	Gln	His	Lys	Glu	Cys	Ala	Glu	Pro	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	
		335				340					345					350	
65	GCG	GAA	AAG	GAC	AGC	AAT	TAC	TGT	CTC	TGC	AGG	ACA	CCC	TGC	AAC	CTA	1225
	Ala	Glu	Lys	Asp	Ser	Asn	Tyr	Cys	Leu	Cys	Arg	Thr	Pro	Cys	Asn	Leu	
				355						360					365		
70	ACC	CGC	TAC	AAC	AAA	GAG	CTC	TCC	ATG	GTG	AAG	ATC	CCC	AGC	AAG	ACA	1273
	Thr	Arg	Tyr	Asn	Lys	Glu	Leu	Ser	Met	Val	Lys	Ile	Pro	Ser	Lys	Thr	
				370					375					380			



2023年3月31日

INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:4 :

- i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

A) LONGUEUR : 3647 paires de base

B) TYPE : acide nucléique

C) NOMBRE DE BRINS : double

D) CONFIGURATION : linéaire

ii) TYPE DE MOLECULE : ADN

vi) ORIGINE : rat

ix) CARACTERISTIQUE

A) NOM/CLE : ASIC1B

B) LOCALISATION : 109 .. 1785

xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:4 :

CTGCCACAGA GGCTCTGGTG AGGAAGGACA GACAGCTGGA CCGGCGCAGA CCTAGCCGAA 60

GTCCAACCTC CGTCCCTTCT GGTGGCTTCT TCCTGTCTCC TGAACAAG ATG CCC ATC 117  
Met Pro Ile  
1 3

CAG ATC TTT TGT TCT GTG TCA TTC TCC TCT GGA GAG GAG GCC CCG GGA 165  
Gln Ile Phe Cys Ser Val Ser Phe Ser Ser Gly Glu Glu Ala Pro Gly  
5 10 15

TCC ATG GCA GAT ATC TGG GGT CCC CAC CAC CAC CGG CAG CAG CAG CAG 213  
Ser Met Ala Asp Ile Trp Gly Pro His His His Arg Gln Gln Gln Asp  
20 25 30 35

AGC TCA GAA TCG GAA GAA GAG GAA GAG AAG GAA ATG GAG GCA GGG TCG 261  
Ser Ser Glu Ser Glu Glu Glu Glu Glu Lys Glu Met Glu Ala Gly Ser  
40 45 50

GAG TTG GAT GAG GGT GAT GAC TCA CCT AGG GAC TTG GTG GCC TTC GCC 309  
Glu Leu Asp Glu Gly Asp Asp Ser Pro Arg Asp Leu Val Ala Phe Ala  
55 60 65

AAC AGC TGT ACC TTC CAT GGT GCC AGC CAT GTG TTT GTG GAA GGG GGC 357  
Asn Ser Cys Thr Phe His Gly Ala Ser His Val Phe Val Glu Gly Gly  
70 75 80

CCA GGG CCA AGG CAG GCC TTA TGG GCA GTG GCC TTT GTC ATA GCA CTG 405  
Pro Gly Pro Arg Gln Ala Leu Trp Ala Val Ala Phe Val Ile Ala Leu  
85 90 95

GGT GCC TTC CTG TGC CAG GTA GGG GAC CGC GTT GCT TAT TAC CTC AGC 453  
Gly Ala Phe Leu Cys Gln Val Gly Asp Arg Val Ala Tyr Tyr Leu Ser  
100 105 110 115

TAC CCA CAC GTG ACT TTG CTA GAC GAA GTG GCC ACC ACG GAG CTG GTC 501  
Tyr Pro His Val Thr Leu Leu Asp Glu Val Ala Thr Thr Glu Leu Val  
120 125 130

55

	TTC	CCA	GCT	GTC	ACC	TTC	TGC	AAC	ACC	AAT	GCC	GTG	CGG	TTG	TCC	CAG	549
	Phe	Pro	Ala	Val	Thr	Phe	Cys	Asn	Thr	Asn	Ala	Val	Arg	Leu	Ser	Gln	
				135					140					145			
5	CTC	AGC	TAC	CCT	GAC	TTG	CTC	TAC	CTG	GCC	CCC	ATG	CTA	GGA	CTG	GAT	597
	Leu	Ser	Tyr	Pro	Asp	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ala	Pro	Met	Leu	Gly	Leu	Asp	
			150					155					160				
10	GAG	AGT	GAT	GAC	CCC	GGG	GTG	CCC	CTT	GCT	CCT	CCT	GGC	CCA	GAG	GCT	645
	Glu	Ser	Asp	Asp	Pro	Gly	Val	Pro	Leu	Ala	Pro	Pro	Gly	Pro	Glu	Ala	
			165				170					175					
15	TTC	TCC	GGG	GAG	CCT	TTT	AAC	CTC	CAT	CGT	TTC	TAT	AAT	CGC	TCT	TGC	693
	Phe	Ser	Gly	Glu	Pro	Phe	Asn	Leu	His	Arg	Phe	Tyr	Asn	Arg	Ser	Cys	
	180					185					190					195	
	CAC	CGG	CTG	GAG	GAC	ATG	CTG	CTC	TAT	TGT	TCC	TAC	TGT	GGG	GGC	CCC	741
	His	Arg	Leu	Glu	Asp	Met	Leu	Leu	Tyr	Cys	Ser	Tyr	Cys	Gly	Gly	Pro	
					200					205					210		
20	TGT	GGT	CCC	CAC	AAC	TTC	TCA	GTG	GTC	TTC	ACT	CGG	TAT	GGG	AAG	TGT	789
	Cys	Gly	Pro	His	Asn	Phe	Ser	Val	Val	Phe	Thr	Arg	Tyr	Gly	Lys	Cys	
				215					220					225			
25	TAC	ACA	TTC	AAC	TCG	GGC	CAA	GAT	GGG	CGG	CCA	CGG	CTG	AAG	ACC	ATG	837
	Tyr	Thr	Phe	Asn	Ser	Gly	Gln	Asp	Gly	Arg	Pro	Arg	Leu	Lys	Thr	Met	
			230					235					240				
30	AAA	GGT	GGG	ACT	GGC	AAT	GGC	CTG	GAG	ATC	ATG	CTG	GAC	ATT	CAG	CAA	885
	Lys	Gly	Gly	Thr	Gly	Asn	Gly	Leu	Glu	Ile	Met	Leu	Asp	Ile	Gln	Gln	
		245				250						255					
35	GAT	GAA	TAT	TTG	CCT	GTG	TGG	GGA	GAG	ACC	GAC	GAG	ACA	TCC	TTC	GAA	933
	Asp	Glu	Tyr	Leu	Pro	Val	Trp	Gly	Glu	Thr	Asp	Glu	Thr	Ser	Phe	Glu	
	260					265					270					275	
40	GCA	GGC	ATC	AAA	GTG	CAG	ATC	CAC	AGT	CAG	GAT	GAA	CCC	CCT	TTC	ATC	981
	Ala	Gly	Ile	Lys	Val	Gln	Ile	His	Ser	Gln	Asp	Glu	Pro	Pro	Phe	Ile	
					280					285					290		
45	GAC	CAG	CTG	GGC	TTT	GGT	GTG	GCT	CCA	GGT	TTC	CAG	ACG	TTT	GTG	TCT	1029
	Asp	Gln	Leu	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Pro	Gly	Phe	Gln	Thr	Phe	Val	Ser	
				295					300					305			
50	TGC	CAG	GAG	CAG	AGG	CTC	ATC	TAC	CTG	CCC	TCA	CCC	TGG	GGC	ACC	TGC	1077
	Cys	Gln	Glu	Gln	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Pro	Ser	Pro	Trp	Gly	Thr	Cys	
			310					315					320				
55	AAT	GCT	GTT	ACC	ATG	GAC	TCG	GAT	TTC	TTC	GAC	TCC	TAC	AGC	ATC	ACT	1125
	Asn	Ala	Val	Thr	Met	Asp	Ser	Asp	Phe	Phe	Asp	Ser	Tyr	Ser	Ile	Thr	
		325				330						335					
60	GCC	TGC	CGG	ATT	GAT	TGC	GAG	ACG	CGT	TAC	CTG	GTG	GAG	AAC	TGC	AAC	1173
	Ala	Cys	Arg	Ile	Asp	Cys	Glu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Val	Glu	Asn	Cys	Asn	
	340					345					350					355	

	TGC	CGT	ATG	GTG	CAC	ATG	CCA	GGG	GAC	GCC	CCA	TAC	TGC	ACT	CCA	GAG	1221
	Cys	Arg	Met	Val	His	Met	Pro	Gly	Asp	Ala	Pro	Tyr	Cys	Thr	Pro	Glu	
				360						365					370		
5	CAG	TAC	AAG	GAG	TGT	GCA	GAT	CCT	GCC	CTG	GAC	TTC	CTA	GTG	GAG	AAA	1269
	Gln	Tyr	Lys	Glu	Cys	Ala	Asp	Pro	Ala	Leu	Asp	Phe	Leu	Val	Glu	Lys	
				375					380					385			
10	GAC	CAG	GAA	TAC	TGC	GTG	TGT	GAG	ATG	CCT	TGC	AAC	CTG	ACC	CGC	TAC	1317
	Asp	Gln	Glu	Tyr	Cys	Val	Cys	Glu	Met	Pro	Cys	Asn	Leu	Thr	Arg	Tyr	
			390					395					400				
15	GGC	AAG	GAG	CTG	TCC	ATG	GTC	AAG	ATC	CCA	AGC	AAA	GCC	TCC	GCC	AAG	1365
	Gly	Lys	Glu	Leu	Ser	Met	Val	Lys	Ile	Pro	Ser	Lys	Ala	Ser	Ala	Lys	
		405					410					415					
20	TAC	CTG	GCC	AAG	AAG	TTC	AAC	AAA	TCG	GAG	CAG	TAC	ATA	GGG	GAG	AAC	1413
	Tyr	Leu	Ala	Lys	Lys	Phe	Asn	Lys	Ser	Glu	Gln	Tyr	Ile	Gly	Glu	Asn	
						425						430				435	
25	ATT	CTG	GTG	CTG	GAC	ATT	TTC	TTT	GAA	GTC	CTC	AAC	TAT	GAG	ACC	ATC	1461
	Ile	Leu	Val	Leu	Asp	Ile	Phe	Phe	Glu	Val	Leu	Asn	Tyr	Glu	Thr	Ile	
					440					445					450		
30	GAG	CAG	AAA	AAG	GCC	TAT	GAG	ATC	GCA	GGG	CTG	TTG	GGT	GAC	ATC	GGG	1509
	Glu	Gln	Lys	Lys	Ala	Tyr	Glu	Ile	Ala	Gly	Leu	Leu	Gly	Asp	Ile	Gly	
				455					460					465			
35	GGC	CAG	ATG	GGG	TTG	TTC	ATC	GGT	GCC	AGC	ATC	CTC	ACC	GTG	CTG	GAA	1557
	Gly	Gln	Met	Gly	Leu	Phe	Ile	Gly	Ala	Ser	Ile	Leu	Thr	Val	Leu	Glu	
			470					475					480				
40	CTC	TTT	GAC	TAT	GCC	TAC	GAG	GTC	ATT	AAG	CAC	AGG	CTG	TGC	AGA	CGT	1605
	Leu	Phe	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Glu	Val	Ile	Lys	His	Arg	Leu	Cys	Arg	Arg	
			485				490					495					
45	GGA	AAG	TGC	CAG	AAG	GAG	GCT	AAG	AGG	AGC	AGC	GCA	GAC	AAG	GGC	GTG	1653
	Gly	Lys	Cys	Gln	Lys	Glu	Ala	Lys	Arg	Ser	Ser	Ala	Asp	Lys	Gly	Val	
						505					510					515	
50	GCG	CTC	AGC	CTG	GAT	GAC	GTC	AAA	AGA	CAC	AAT	CCC	TGC	GAG	AGC	CTC	1701
	Ala	Leu	Ser	Leu	Asp	Asp	Val	Lys	Arg	His	Asn	Pro	Cys	Glu	Ser	Leu	
					520					525					530		
55	CGA	GGA	CAT	CCT	GCC	GGG	ATG	ACG	TAC	GCT	GCC	AAC	ATC	CTA	CCT	CAC	1749
	Arg	Gly	His	Pro	Ala	Gly	Met	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asn	Ile	Leu	Pro	His	
				535					540					545			
60	CAT	CCC	GCT	CGA	GGC	ACG	TTT	GAG	GAC	TTT	ACC	TGC	TAA	CCCCTCGCAG			1798
	His	Pro	Ala	Arg	Gly	Thr	Phe	Glu	Asp	Phe	Thr	Cys	*				
			550				55					559					
	GCCGCTGTAC	CAAAGGCCTA	GGTGGGGAGG	GCTGGGGGAG	CAAGGGGCCC	CCAAC TGCCC											1858
65	CCAGCTACCC	TGTGGACTTA	ACTGCATTCC	TGGTCAGTGG	TTCCCTCTTG	TCTGTGGTGA											1918
	GAAAGGAGTC	TTGACCATAG	AGTCCTCTCC	CAGCCTCTAT	CCCATCTTTT	TATTTTAAATT											1978
	TAATCACATT	TGCTCTGTAA	TATTGCTTGA	GGCTGGGGAT	CGTGATTTCC	CCCCAGTTCT											2038

	TTTATTGTTG	AGAATAGTTT	TCTCTATTCT	GGGTTTTCTG	TTATTTCAAA	TGAATCTGCA	2098
	AATTGCTCTT	CCCATCTCTA	TGAAGAATTG	CGTTGGAATT	TTGATGGGGA	TTGTATTGAA	2158
5	TCTGTAGATT	GCCTTTGGTA	AGATGGCCAT	TTTTACTATG	TTAATCCTGC	CAATTCATGA	2218
	GCAAGGGAGA	TCTTTCTATC	TCTGAAATCT	ACTTCAGTTT	CTTCTTCAG	AGACTTGAAG	2278
10	TTCTTGTCAT	AAAAATC'TTT	TTGGTTAGAG	CCACACCAAG	GTATTTTATA	TTGTTTGTGA	2338
	CTATTGTGAA	TGGTGTCAAT	TCCCTAATTT	CCTTCTCAGC	CTACTTATCC	TTTGAGTAGA	2398
	GGAAGGCTTC	TGATTTGTTT	GGGTAAATTT	TATACCCAGC	TGCTTTGCTA	AAGTTCTTTA	2458
15	TCAGGTTTAG	GTGTTCTCTG	GTGGAAC'TTT	TGGGGTCACG	TAAGAATACT	ATTATATCAT	2518
	CTGCAAATAG	TGATATTTCA	CTTCTTCCTT	TCCAATTTCT	ATCCCTCTGG	GGACTTTTTG	2578
20	TTGTCTAATT	GCTCTGGCTA	GGACTTCAA	TTCTATATTG	AATAGATAGG	GAGAGAGTGG	2638
	GCAGCCTTGT	CTAGTTCCCTG	GTTTTCTGTG	GATCGCTTCA	AATTTCTCTC	CATTTAGTTT	2698
	GATATTGGCT	ACTGGTTTGC	TGTATATGGC	TTTTACTGTA	CTTAGGTATG	GGCCTTGAAT	2758
25	TCCTGATATT	TCCAAGACTT	TTAACATGAA	GGGGTTTTGA	AATTTGCCAA	ATGCTTTCTC	2818
	AGCATCTAAT	GAGATGATCA	TGTGCCCTCC	CCCCACCTTG	AGTTTGT'TTA	TATAGTGGGT	2878
30	TACATGAAAG	GATCATTTCT	AATAGTCCAC	AAGTCTGCCA	AATCTTGCTG	ATTGTGACTC	2938
	ATTTCCATAG	CAGGCTCTAT	AACTTCTCTA	ACAGATTGCA	TTAAACTCTG	CTTGGGGAAG	2998
	GCATTACCTC	TTGGTTGAAG	CAATGTTGTA	GTTTCTATGC	CTGCTGAGTA	AATAGCCTCA	3058
35	AGTCCAAGTA	CTTGCCCAGA	CTAATGATCA	AACGTATCCA	GGAGTTCCAT	ACCAGAGATG	3118
	TACTCTTCTC	TCCTTTGAAG	TACATTGCTG	GAAGAGTAAT	TGTGTTTGCT	AGAGATACTC	3178
40	CTTCGAACTG	CAAAAGAAAT	CTCTTGGCTA	AGCATATAAT	CAAGCCTCAG	GTTTTCTTTT	3238
	TATTAAATAG	CTGCTTGTA	GAAAGTGGAC	ACTAAGCATA	TACCTCAAAG	GGAGACAGAA	3298
	TGACTCTGTG	CCTTCACTGA	TGGAAGTCTG	GGTTACAAAT	TACATCAGAA	GAACCTATCA	3358
45	TAGTGAAACA	TCTCATTTCC	CTGGTATAAT	CCCTTCTAGA	AATACACTTG	TGACTCTGAA	3418
	ATGTTATAAT	CGTGACAAC	AGGCTGTTAC	AGATACACCA	AGTTAAATTT	GATAGAGAAA	3478
50	CCAGGCTTGG	AGCCTCATGT	CCATAGGGCA	AGAGGAAGAT	GCTGAGTGTT	TAAGGTTGGT	3538
	TTGAGCGAAG	AACAATACCT	TGTGTCACAA	AAATGAAAGG	AAAAAAGAAA	AAAGGAAAGA	3598
	AGGAAAGAAA	GAGAGAGAAA	GAAAAAGAAA	GAAAGAAAAA	AAAAAATAA		3647

INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:5 :

i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

A) LONGUEUR 1602 paires de base

B) TYPE : acide nucléique

C) NOMBRE DE BRINS : double

D) CONFIGURATION : linéaire

ii) TYPE DE MOLECULE : ADN

vi) ORIGINE : rat

ix) CARACTERISTIQUE

A) NOM/CLE : DRASIC

B) LOCALISATION : 1 .. 1602

xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:5 :

ATG AAA CCT CGC TCC GGA CTG GAG GAG GCC CAG CGG CGA CAG GCC TCA	48
Met Lys Pro Arg Ser Gly Leu Glu Glu Ala Gln Arg Arg Gln Ala Ser	
1 5 10 15	
GAC ATC CGG GTG TTT GCC AGC AGC TGC ACA ATG CAT GGT CTG GGC CAC	96
Asp Ile Arg Val Phe Ala Ser Ser Cys Thr Met His Gly Leu Gly His	
20 25 30	
ATC TTT GGC CCT GGA GGC CTG ACC CTG CGC CGA GGG CTG TGG GCC ACA	144
Ile Phe Gly Pro Gly Gly Leu Thr Leu Arg Arg Gly Leu Trp Ala Thr	
35 40 45	
GCT GTG CTC CTG TCG CTG GCG GCC TTC CTC TAC CAG GTG GCT GAG CGG	192
Ala Val Leu Leu Ser Leu Ala Ala Phe Leu Tyr Gln Val Ala Glu Arg	
50 55 60	
GTT CGC TAC TAT GGG GAG TTC CAC CAT AAG ACC ACC CTG GAT GAG CGT	240
Val Arg Tyr Tyr Gly Glu Phe His His Lys Thr Thr Leu Asp Glu Arg	
65 70 75 80	
GAG AGC CAC CAG CTC ACC TTC CCA GCT GTG ACT CTG TGT AAT ATC AAC	288
Glu Ser His Gln Leu Thr Phe Pro Ala Val Thr Leu Cys Asn Ile Asn	
85 90 95	
CCA CTG CGC CGC TCA CGC CTC ACA CCC AAT GAC TTG CAC TGG GCT GGA	336
Pro Leu Arg Arg Ser Arg Leu Thr Pro Asn Asp Leu His Trp Ala Gly	
100 105 110	
ACA GCG CTG CTG GGC CTG GAC CCT GCT GAA CAT GCT GCC TAC CTT CGT	384
Thr Ala Leu Leu Gly Leu Asp Pro Ala Glu His Ala Ala Tyr Leu Arg	
115 120 125	
GCA CTG GGC CAG CCC CCC GCA CCA CCT GGC TTC ATG CCC AGT CCG ACC	432
Ala Leu Gly Gln Pro Pro Ala Pro Pro Gly Phe Met Pro Ser Pro Thr	
130 135 140	
TTT GAC ATG GCA CAA CTC TAC GCC AGA GCC GGC CAC TCC CTT GAG GAC	480
Phe Asp Met Ala Gln Leu Tyr Ala Arg Ala Gly His Ser Leu Glu Asp	
145 150 155 160	

	ATG	TTG	TTG	GAT	TGC	CGA	TAC	CGT	GGC	CAG	CCC	TGT	GGG	CCT	GAG	AAC	528
	Met	Leu	Leu	Asp	Cys	Arg	Tyr	Arg	Gly	Gln	Pro	Cys	Gly	Pro	Glu	Asn	
					165					170					175		
5	TTC	ACA	GTG	ATC	TTT	ACT	CGA	ATG	GGG	CAA	TGC	TAC	ACC	TTC	AAC	TCT	576
	Phe	Thr	Val	Ile	Phe	Thr	Arg	Met	Gly	Gln	Cys	Tyr	Thr	Phe	Asn	Ser	
				180					185					190			
10	GGT	GCC	CAC	GGT	GCA	GAG	CTG	CTC	ACC	ACT	CCA	AAG	GGT	GGT	GCT	GGC	624
	Gly	Ala	His	Gly	Ala	Glu	Leu	Leu	Thr	Thr	Pro	Lys	Gly	Gly	Ala	Gly	
			195					200					205				
15	AAC	GGA	CTG	GAG	ATT	ATG	CTA	GAT	GTA	CAG	CAA	GAG	GAG	TAT	CTG	CCC	672
	Asn	Gly	Leu	Glu	Ile	Met	Leu	Asp	Val	Gln	Gln	Glu	Glu	Tyr	Leu	Pro	
		210					215					220					
20	ATC	TGG	AAG	GAC	ATG	GAA	GAG	ACC	CCG	TTT	GAG	GTG	GGG	ATC	CGA	GTG	720
	Ile	Trp	Lys	Asp	Met	Glu	Glu	Thr	Pro	Phe	Glu	Val	Gly	Ile	Arg	Val	
	225					230					235					240	
25	CAG	ATT	CAC	AGC	CAG	GAT	GAG	CCC	CCT	GCC	ATT	GAC	CAG	CTG	GGC	TTC	768
	Gln	Ile	His	Ser	Gln	Asp	Glu	Pro	Pro	Ala	Ile	Asp	Gln	Leu	Gly	Phe	
					245					250					255		
30	GGG	GCA	GCC	CCA	GGC	CAT	CAG	ACT	TTT	GTG	TCC	TGT	CAG	CAG	CAG	CAA	816
	Gly	Ala	Ala	Pro	Gly	His	Gln	Thr	Phe	Val	Ser	Cys	Gln	Gln	Gln	Gln	
				260					265					270			
35	CTG	AGT	TTC	CTG	CCA	CCA	CCC	TGG	GGT	GAC	TGC	AAT	ACC	GCA	TCT	TTG	864
	Leu	Ser	Phe	Leu	Pro	Pro	Pro	Trp	Gly	Asp	Cys	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	
			275					280					285				
40	GAT	CCC	GAC	GAC	TTT	GAT	CCA	GAG	CCC	TCT	GAT	CCC	TTG	GGT	TCC	CCC	912
	Asp	Pro	Asp	Asp	Phe	Asp	Pro	Glu	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	
		290					295					300					
45	AGA	CCC	AGA	CCC	AGC	CCT	CCT	TAT	AGT	TTA	ATA	GGT	TGT	CGC	CTG	GCC	960
	Arg	Pro	Arg	Pro	Ser	Pro	Pro	Tyr	Ser	Leu	Ile	Gly	Cys	Arg	Leu	Ala	
	305					310					315					320	
50	TGT	GAG	TCT	CGC	TAT	GTG	GCT	CGG	AAG	TGT	GGC	TGT	CGA	ATG	ATG	CAT	1008
	Cys	Glu	Ser	Arg	Tyr	Val	Ala	Arg	Lys	Cys	Gly	Cys	Arg	Met	Met	His	
					325					330					335		
55	ATG	CCT	GGA	AAC	TCC	CCA	GTG	TGC	AGC	CCC	CAG	CAG	TAC	AAG	GAC	TGC	1056
	Met	Pro	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Cys	Ser	Pro	Gln	Gln	Tyr	Lys	Asp	Cys	
				340					345					350			
60	GCC	AGC	CCA	GCT	CTG	GAC	GCT	ATG	CTG	CGA	AAG	GAC	ACG	TGT	GTC	TGC	1104
	Ala	Ser	Pro	Ala	Leu	Asp	Ala	Met	Leu	Arg	Lys	Asp	Thr	Cys	Val	Cys	
			355					360					365				
65	CCC	AAC	CCG	TGC	GCT	ACT	ACA	CGC	TAT	GCC	AAG	GAG	CTC	TCC	ATG	GTG	1152
	Pro	Asn	Pro	Cys	Ala	Thr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Lys	Glu	Leu	Ser	Met	Val	
		370					375					380					
70	CGG	ATT	CCC	AGC	CGC	GCG	TCA	GCT	CGC	TAC	CTG	GCC	CGG	AAA	TAC	AAC	1200
	Arg	Ile	Pro	Ser	Arg	Ala	Ser	Ala	Arg	Tyr	Leu	Ala	Arg	Lys	Tyr	Asn	
	385					390					395					400	

25 30 35



INFORMATION CONCERNANT LA SEQ ID NO:6 :

i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

A) LONGUEUR 1948 paires de base

B) TYPE : acide nucléique

C) NOMBRE DE BRINS : double

D) CONFIGURATION : linéaire

ii) TYPE DE MOLECULE : ADN

vi) ORIGINE : rat

ix) CARACTERISTIQUE

A) NOM/CLE : MDEG2

B) LOCALISATION : 16 .. 1707

xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID NO:6 :

CCTCGGGCTG AATGA ATG AGC CGG AGC GGC GGA GCC CGG CTG CCC GCG ACC	51
Met Ser Arg Ser Gly Gly Ala Arg Leu Pro Ala Thr	
1 5 10	
GCG CTC AGC GGC CCG GGA CGC TTC CGT ATG GCC CGC GAG CAG CCG GCG	99
Ala Leu Ser Gly Pro Gly Arg Phe Arg Met Ala Arg Glu Gln Pro Ala	
15 20 25	
CCC GTG GCG GTG GCG GCA GCT AGG CAG CCC GGA GGA GAC CGG AGC GGC	147
Pro Val Ala Val Ala Ala Arg Gln Pro Gly Gly Asp Arg Ser Gly	
30 35 40	
GAT CCG GCG CTG CAG GGG CCA GGG GTC GCC CGC AGG GGG CGG CCG TCC	195
Asp Pro Ala Leu Gln Gly Pro Gly Val Ala Arg Arg Gly Arg Pro Ser	
45 50 55 60	
CTG AGT CGC ACT AAA TTG CAC GGG CTG CGG CAC ATG TGC GCG GGG CGC	243
Leu Ser Arg Thr Lys Leu His Gly Leu Arg His Met Cys Ala Gly Arg	
65 70 75	
ACG GCG GCG GGA GGC TCT TTC CAG CGA CGG GCG CTG TGG GTG CTG GCC	291
Thr Ala Ala Gly Gly Ser Phe Gln Arg Arg Ala Leu Trp Val Leu Ala	
80 85 90	
TTC TGC ACG TCC CTC GGC TTG CTG CTG TCC TGG TCC TCG AAC CGC CTG	339
Phe Cys Thr Ser Leu Gly Leu Leu Leu Ser Trp Ser Ser Asn Arg Leu	
95 100 105	
CTC TAC TGG CTC AGC TTC CCG TCA CAC ACA CGA GTG CAC CGT GAG TGG	387
Leu Tyr Trp Leu Ser Phe Pro Ser His Thr Arg Val His Arg Glu Trp	
110 115 120	
AGC CGC CAG CTG CCG TTC CCC GCC GTC ACC GTG TGC AAC AAC AAC CCC	435
Ser Arg Gln Leu Pro Phe Pro Ala Val Thr Val Cys Asn Asn Asn Pro	
125 130 135 140	
CTG CGC TTC CCG CGC CTC TCC AAG GGG GAC CTC TAC TAC GCG GGC CAC	483
Leu Arg Phe Pro Arg Leu Ser Lys Gly Asp Leu Tyr Tyr Ala Gly His	
145 150 155	

	TGG	CTA	GGG	CTG	CTG	CTT	CCC	AAC	CGC	ACC	GCG	CGC	CCG	CTG	GTC	AGC	531
	Trp	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Pro	Asn	Arg	Thr	Ala	Arg	Pro	Leu	Val	Ser	
			160					165						170			
5	GAG	CTG	CTG	CGG	GGC	GAC	GAG	CCG	CGC	CGC	CAG	TGG	TTC	CGC	AAA	CTG	579
	Glu	Leu	Leu	Arg	Gly	Asp	Glu	Pro	Arg	Arg	Gln	Trp	Phe	Arg	Lys	Leu	
			175					180					185				
10	GCC	GAC	TTC	CGC	CTC	TTC	CTG	CCG	CCG	CGC	CAC	TTC	GAG	GGC	ATC	AGC	627
	Ala	Asp	Phe	Arg	Leu	Phe	Leu	Pro	Pro	Arg	His	Phe	Glu	Gly	Ile	Ser	
		190					195					200					
15	GCT	GCC	TTC	ATG	GAC	CGT	TTG	GGC	CAC	CAG	CTG	GAG	GAT	ATG	CTG	CTC	675
	Ala	Ala	Phe	Met	Asp	Arg	Leu	Gly	His	Gln	Leu	Glu	Asp	Met	Leu	Leu	
	205				210						215					220	
20	TCC	TGC	AAG	TAC	CGG	GGC	GAG	CTC	TGT	GGC	CCG	CAC	AAC	TTC	TCC	TCA	723
	Ser	Cys	Lys	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Cys	Gly	Pro	His	Asn	Phe	Ser	Ser	
					225					230					235		
25	GTG	TTT	ACA	AAA	TAC	GGG	AAG	TGT	TAC	ATG	TTT	AAC	TCA	GGC	GAG	GAT	771
	Val	Phe	Thr	Lys	Tyr	Gly	Lys	Cys	Tyr	Met	Phe	Asn	Ser	Gly	Glu	Asp	
				240					245					250			
30	GGC	AAG	CCG	CTG	CTC	ACC	ACG	GTC	AAG	GGG	GGG	ACG	GGC	AAC	GGG	CTG	819
	Gly	Lys	Pro	Leu	Leu	Thr	Thr	Val	Lys	Gly	Gly	Thr	Gly	Asn	Gly	Leu	
			255					260					265				
35	GAG	ATC	ATG	CTG	GAC	ATT	CAG	CAA	GAT	GAG	TAC	CTG	CCC	ATC	TGG	GGA	867
	Glu	Ile	Met	Leu	Asp	Ile	Gln	Gln	Asp	Glu	Tyr	Leu	Pro	Ile	Trp	Gly	
		270				275						280					
40	GAG	ACA	GAG	GAA	ACA	ACG	TTT	GAA	GCA	GGA	GTG	AAG	GTT	CAG	ATC	CAC	915
	Glu	Thr	Glu	Glu	Thr	Thr	Phe	Glu	Ala	Gly	Val	Lys	Val	Gln	Ile	His	
	285					290					295					300	
45	AGT	CAG	TCT	GAG	CCG	CCT	TTC	ATC	CAA	GAG	CTG	GGC	TTT	GGG	GTG	GCT	963
	Ser	Gln	Ser	Glu	Pro	Pro	Phe	Ile	Gln	Glu	Leu	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	
					305					310					315		
50	CCG	GGG	TTC	CAG	ACC	TTC	GTG	GCC	ACA	CAA	GAG	CAG	AGG	CTC	ACA	TAT	1011
	Pro	Gly	Phe	Gln	Thr	Phe	Val	Ala	Thr	Gln	Glu	Gln	Arg	Leu	Thr	Tyr	
				320					325					330			
55	CTG	CCC	CCA	CCA	TGG	GGG	GAG	TGC	CGG	TCC	TCA	GAG	ATG	GGA	CTC	GAC	1059
	Leu	Pro	Pro	Pro	Trp	Gly	Glu	Cys	Arg	Ser	Ser	Glu	Met	Gly	Leu	Asp	
			335					340					345				
60	TTC	TTT	CCT	GTT	TAC	AGC	ATC	ACA	GCC	TGT	CGG	ATT	GAC	TGT	GAG	ACC	1107
	Phe	Phe	Pro	Val	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ala	Cys	Arg	Ile	Asp	Cys	Glu	Thr	
		350					355					360					
65	CGC	TAC	ATC	GTG	GAG	AAC	TGT	AAC	TGC	CGC	ATG	GTC	CAC	ATG	CCA	GGG	1155
	Arg	Tyr	Ile	Val	Glu	Asn	Cys	Asn	Cys	Arg	Met	Val	His	Met	Pro	Gly	
	365					370					375					380	

[illegible]

## REVENDICATIONS

5 1) Protéine constituant un canal cationique neuronal de mammifère sensible à l'amiloride et activé par les protons.

10 2) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ IS No : 1 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

15 3) Protéine selon l'une des revendications 1 ou 2 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 2 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

20 4) Protéine selon l'une des revendications 1 ou 2 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3 ou un dérivé fonctionnelllement équivalent de cette protéine.

25 5) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 4 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

30 6) Protéine selon la revendication 1 dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 5 ou un dérivé fonctionnellement équivalent de cette protéine.

35 7) Canal cationique hybride constitué de l'association d'une première protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'une quelconque des

revendications 1 à 6 avec une seconde protéine constituant un canal ionique activé ou non par les protons.

8) Canal cationique hybride constitué de l'association d'une première protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 avec une seconde protéine constituant un canal ionique activé par les protons selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

9) Canal cationique hybride selon la revendication 8, caractérisé en ce que ladite première protéine est une protéine dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4 ou SEQ ID No 5 et la seconde protéine est une protéine dont la séquence en acides aminés est représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3 ou SEQ ID No 6.

10) Anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé contre au moins une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 et/ou contre au moins un canal hybride selon l'une quelconque des revendications 7 à 9.

11) Molécule d'acide nucléique comprenant ou constituée par une séquence nucléique codant pour une protéine constituant un canal cationique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou un canal hybride selon l'une quelconque des revendications 7 à 9.

12) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 11 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 123 et 1700 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe

sous le numéro SEQ ID No : 1, ou sa séquence complémentaire.

13) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 11 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 1 et 1542 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 2, ou sa séquence complémentaire.

14) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 11 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 127 et 1663 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 3, ou sa séquence complémentaire.

15) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 11 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 109 et 1785 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 4, ou sa séquence complémentaire.

16) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 11 comprenant ou constituée par la séquence nucléique comprise entre les nucléotides 1 et 1602 de la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No : 5, ou sa séquence complémentaire.

17) Vecteur comprenant au moins une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 11 à 16, avantageusement associée à des séquences de contrôle.

18) Procédé de production d'une protéine constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou un canal hybride selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 11 à 16 ou un vecteur selon la revendication 17 dans un hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant le canal ionique,

- à isoler, par tous moyens appropriés les protéines constituant les canaux ioniques.

19) Procédé d'expression d'une protéine constituant un canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou un canal hybride selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, dans hôte cellulaire, caractérisé en ce qu'il consiste :

- à transférer une molécule d'acide nucléique selon l'une des revendications 11 à 16 ou un vecteur selon la revendication 17 dans ledit hôte cellulaire,

- à cultiver ledit hôte cellulaire dans des conditions permettant la production de la protéine constituant le canal ionique.

20) Procédé selon l'une des revendications 18 ou 19, caractérisé en ce que l'hôte cellulaire est choisi parmi les procaryotes ou les eucaryotes et notamment parmi les bactéries, les levures, les cellules de mammifères, de plantes ou d'insectes.

21) Cellule transformée exprimant des canaux cationiques neuronaux de mammifère sensibles à l'amiloride

et activés par les protons, obtenue par le procédé selon l'une des revendications 18 à 20.

5 22) Procédé de criblage de substances  
capables de moduler l'activité de canaux ioniques  
neuronaux de mammifère, caractérisé en ce que l'on met en  
contact des quantités variables d'une substance à tester  
avec des cellules selon la revendication 21, puis l'on  
10 mesure, par tous moyens appropriés, les effets éventuels  
de ladite substance sur les courants des canaux  
cationiques sensibles à l'amiloride et activés par les  
protons.

23) Procédé selon la revendication 22  
appliqué au criblage de substances capables de moduler la  
perception de l'acidité, tant en ce qui concerne la  
nociception que la transduction du goût.

24) Composition pharmaceutique comprenant  
comme principe actif au moins une protéine constituant un  
canal ionique selon l'une quelconque des revendications 1  
à 6 ou un canal hybride selon l'une quelconque 7 à 9 ou  
encore un anticorps selon la revendication 10.

25 25) Utilisation d'une substance chimique ou  
biologique capable de modifier les courants d'un canal  
ionique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6  
et/ou un canal hybride selon l'une quelconque des  
revendications 7 à 9 pour la préparation d'un médicament  
30 capable de moduler la perception de l'acidité, tant en ce  
qui concerne la nociception que la transduction du goût,  
chez un sujet humain ou animal.



NOUVEAU CANAL CATIONIQUE NEURONAL DE  
MAMMIFÈRE SENSIBLE A L'ACIDITÉ, SON CLONAGE ET SES  
APPLICATIONS.

5 L'invention concerne une protéine  
constituant un canal cationique neuronal de mammifère  
sensible à l'amiloride et activé par les protons, ainsi  
que les molécules d'acide nucléique codant cette protéine.

10 L'invention concerne aussi un procédé de  
criblage de substances capables de moduler l'activité de  
canaux ioniques neuronaux de mammifère.

005000"05262760